

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe - Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. Hermann Hepp

**Thrombophile Genmutationen bei Patientinnen mit rezidivierenden
Spontanaborten unklarer Genese**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Nina Rogenhofer
aus Regensburg

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. C.J. Thaler

Mitberichterstatter: Prof. Dr. J.-U. Walther M.Sc.
Prof. Dr. med. F. Kainer

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Tina Buchholz

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 29.04.2004

Meinen Eltern in großer Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	Seite 5
1.1. Rezidivierende Spontanaborte	Seite 5
1.1.1. Definition und Epidemiologie	Seite 5
1.1.2. Ätiologie	Seite 5
1.1.3. Genetisch determinierte Ursachen	Seite 7
1.1.4. Infektionen	Seite 7
1.1.5. Uterine Veränderungen	Seite 8
1.1.6. Endokrinologische Gesichtspunkte	Seite 8
1.1.7. Autoimmunerkrankungen und Antiphospholipid-Syndrom (APS)	Seite 9
1.1.8. Alloimmunologische Parameter	Seite 9
1.1.9. Hämostaseologische Aspekte	Seite 10
1.2. Hämostase und Fibrinolyse	Seite 11
1.2.1. Blutgerinnung	Seite 11
1.2.2. Fibrinolyse	Seite 13
1.2.2.1. Rolle des PAI-1 als Fibrinolyse-Inhibitor	Seite 14
1.2.2.2. Fibrinolyse und das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)	Seite 14
1.2.3. Einfluß auf den Verlauf einer Schwangerschaft	Seite 16
1.3. Analytierte Gerinnungsfaktoren	Seite 16
1.3.1. Glykoprotein IIIa (GPIIIa)	Seite 16
1.3.1.1. GPIIIa-Gen	Seite 17
1.3.1.2. GPIIIa-Polymorphismus und thrombotische Komplikationen	Seite 18
1.3.1.3. GPIIIa-Polymorphismus und RSA	Seite 18
1.3.2. Beta-Fibrinogen (β F)	Seite 19
1.3.2.1. Beta-Fibrinogen-Gen	Seite 19
1.3.2.2. Beta-Fibrinogen-Polymorphismus und thrombotische Komplikationen	Seite 19
1.3.2.3. Beta-Fibrinogen-Polymorphismus und RSA	Seite 20
1.3.3. Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1)	Seite 20
1.3.3.1. PAI-1-Gen	Seite 20
1.3.3.2. PAI-1-Polymorphismus und thrombotische Komplikationen	Seite 21

1.3.3.3. PAI-1-Polymorphismus und RSA	Seite 22
1.3.4. Angiotensin-Converting Enzym (ACE)	Seite 23
1.3.4.1. ACE-Gen	Seite 23
1.3.4.2. ACE-Polymorphismus und thrombotische Komplikationen	Seite 24
1.3.4.3. ACE-Polymorphismus und RSA	Seite 25
1.3.5. Interaktion des ACE- und PAI-1-Polymorphismus	Seite 25
1.3.6. Abortmechanismen	Seite 26
1.4. Fragestellungen dieser Arbeit	Seite 27
2. Material und Methoden	Seite 28
2.1. Patienten- und Kontrollkollektiv	Seite 28
2.1.1. Patientenkollektiv	Seite 28
2.1.2. Kontrollkollektiv	Seite 29
2.2. Gruppenbildung der unterschiedlichen Abortmechanismen	Seite 29
2.3. Die Polymerasekettenreaktion	Seite 30
2.3.1. Grundprinzip der PCR	Seite 30
2.3.2. Vor- und Nachteile der PCR	Seite 32
2.4. Material	Seite 33
2.4.1. DNA	Seite 33
2.4.2. Oligonukleotidprimer	Seite 33
2.4.3. Chemikalien	Seite 35
2.4.4. Enzyme	Seite 36
2.4.5. Herstellernachweis der Chemikalien und Geräte	Seite 37
2.5. Methoden	Seite 38
2.5.1. Präparation genomischer DNA aus EDTA-Vollblut	Seite 38
2.5.2. Synthese der Oligonukleotidprimer	Seite 39
2.5.3. Optimierung der PCR	Seite 39
2.5.4. Arbeitsschritte zur Durchführung der PCR	Seite 40
2.5.5. Mitführen von Positiv- und Negativkontrollen	Seite 43
2.5.6. Vorsichtsmaßnahmen zur Kontaminationsvermeidung	Seite 44
2.5.7. Analyse der Polymorphismen	Seite 44
2.5.7.1. Glykoprotein IIIa (GP IIIa)	Seite 44
2.5.7.2. Beta-Fibrinogen (β F)	Seite 45
2.5.7.3. Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1)	Seite 46

2.5.7.4. Angiotensin-Converting Enzym (ACE)	Seite 47
2.5.7.5. Übersicht	Seite 48
2.6. Statistik	Seite 49
3. Ergebnisse	Seite 50
3.1. Demographische Daten und Schwangerschaftsdaten	Seite 50
3.2. Abortdaten	Seite 51
3.3. Glykoprotein IIIa-Polymorphismus	Seite 53
3.4. Beta-Fibrinogen-Polymorphismus	Seite 53
3.5. Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1-Polymorphismus	Seite 54
3.6. Angiotensin-Converting Enzym-Polymorphismus	Seite 55
3.7. PAI-1-Polymorphismus in Kombination mit dem ACE-Polymorphismus	Seite 56
3.8. Abortmechanismen	Seite 57
3.8.1. Abortmechanismus Blutungskomplikation / Abortus incompletus	Seite 58
3.8.2. Abortmechanismus Missed Abortion / Intrauteriner Fruchttod	Seite 60
3.8.3. Abortmechanismus Abortivei	Seite 61
3.8.4. Abortmechanismus Vorzeitiger Blasensprung / PROM	Seite 63
3.8.5. Abortmechanismus Chromosomenstörung / Genabnormalität	Seite 63
4. Diskussion	Seite 64
4.1. Glykoprotein IIIa-Polymorphismus	Seite 65
4.2. Beta-Fibrinogen-Polymorphismus	Seite 67
4.3. Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1-Polymorphismus	Seite 69
4.4. Angiotensin-Converting Enzym-Polymorphismus	Seite 70
4.5. PAI-1-Polymorphismus in Kombination mit dem ACE-Polymorphismus	Seite 72
4.5.1. PAI-4G/4G in Kombination mit dem ACE-D/D	Seite 74
4.5.2. PAI-4G/5G in Kombination mit dem ACE-D/I	Seite 75
4.5.3. PAI-5G/5G in Kombination mit dem ACE-I/I	Seite 75
4.5.4. PAI-Genotypen in Kombination mit den restlichen ACE-Genotypen	Seite 76

4.6. Abortmechanismen	Seite 77
4.6.1. Abortmechanismus Blutungskomplikation / Abortus incompletus	Seite 78
4.6.2. Abortmechanismus Missed Abortion / Intrauteriner Fruchttod	Seite 79
4.6.3. Abortmechanismus Abortivei	Seite 80
4.6.4. Abortmechanismus Vorzeitiger Blasensprung / PROM	Seite 82
4.6.5. Abortmechanismus Chromosomenstörung / Genabnormalität	Seite 82
4.7. Schlussfolgerung	Seite 82
 5. Zusammenfassung	 Seite 85
 6. Anhang	
6.1. Datenerfassungsbogen	Seite 89
6.2. Abkürzungsverzeichnis	Seite 90
 7. Literaturverzeichnis	 Seite 93
 8. Danksagung	 Seite 112
 9. Lebenslauf	 Seite 114

1. Einleitung

1.1. Rezidivierende Spontanaborte

1.1.1. Definition und Epidemiologie

Laut Weltgesundheitsorganisation (WHO) versteht man unter Fehlgeburt oder Abort den vollständigen oder teilweisen Abgang von abgestorbenem Schwangerschaftsmaterial mit einem fetalem Geburtsgewicht von maximal 500g. Derzeit wird in Deutschland jede Schwangerschaftsbeendigung bis einschließlich der 12. Schwangerschaftswoche post menstruationem mit fehlender oder abgestorbener Kindsanlage als Frühabort bezeichnet und bis einschließlich der 24. Schwangerschaftswoche post menstruationem als Spätabort (Kimmig et al., 2000). Im Verlauf jeder Schwangerschaft beträgt das Abortrisiko ca. 15%.

Bei ca. 5% aller gesunder Paare kommt es rezidivierend zu einem Abort, so daß an eine systemische Ursache gedacht werden muss. Das Risiko für eine Fehlgeburt steigt mit der Anzahl der vorangegangenen Abgänge an. Dabei beträgt die Wiederholungswahrscheinlichkeit nach einem Abort ungefähr 21%, nach zwei Aborten 35% und nach drei Aborten bereits über 50% (Strowitzki et al., 1996).

Die WHO definiert „rezidivierende Spontanaborte“ (**RSA**) als das Auftreten von drei oder mehr konsekutiven Spontanaborten vor der 20. SSW.

Weiter werden primäre RSA und sekundäre RSA unterschieden. Hierbei ist von Bedeutung, ob die wiederholten Abgänge bereits mit der ersten SS beginnen (primäre RSA) oder erst nach der Geburt eines gesunden Kindes einsetzen (sekundäre RSA) (Strowitzki et al., 1996).

1.1.2. Ätiologie

Als mögliche Ursachen der krankhaften Fehlgeburtstneigung kommen genetisch determinierte Ursachen, uterine bzw. anatomische Veränderungen, hormonelle Faktoren, Infektionen sowie immunologische und hämostaseologische Störungen in Frage (siehe Abb. 1) (Cramer und Wise 2000, Kuttah 1999).

Die Abklärung erfolgt bei Verdachtsdiagnosen entsprechend gezielt, kann aber auch umfassende Untersuchungen erfordern. Letztendlich frustrierend ist, daß trotz intensiver Diagnostik noch ungefähr 30% der Ursachen ungeklärt bleiben.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Fälle untersucht, bei denen keine systemische Ursache für die wiederholten Fehlgeburten gefunden werden konnte. Demgemäß wurden die Patientinnen erst nach Ausschluß der einzelnen ätiologischen Aspekte in das Patientenkollektiv aufgenommen (siehe Kap. 2.1.).

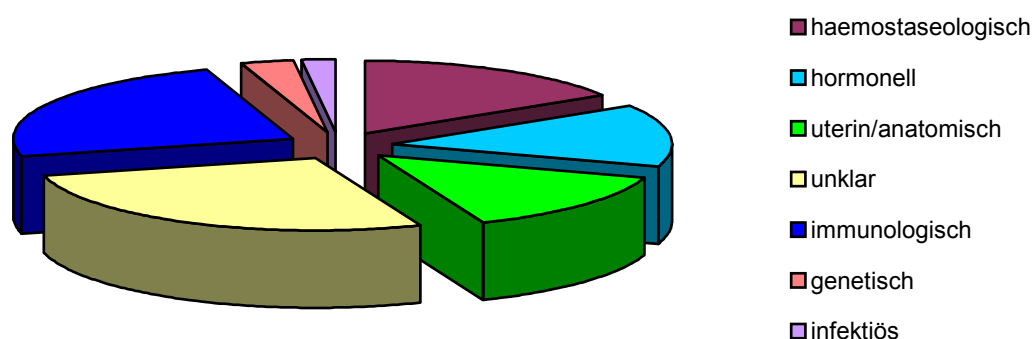


Abb. 1: Ätiologie rezidivierender Fehlgeburten

(modifiziert nach Strowitzki 1996)

Die nachstehende Tabelle zeigt, daß die verschiedenen Ursachen schwerpunktmäßig zu unterschiedlichen Zeiten auftreten:

	vor 6. SSW	6.-10. SSW ohne HA	6.-10. SSW mit HA	10-14. SSW	nach 14. SSW
Hormonell	+++	++	+		
uterin/anatomisch			++	+	
immunologisch	+	+	++	+++	++
Genetisch	+++	+++	++	+	+
Infektiös			+	+	+++
hämostaseologisch	+	+	+	+	++

Tab. 1: Ursachen rezidivierender Fehlgeburten und deren zeitliches Auftreten

SSW = Schwangerschaftswoche, HA = Herzaktion

1.1.3. Genetisch determinierte Ursachen

Hierbei muss man zunächst unterscheiden, ob die Ursache in den elterlichen Chromosomensätzen verankert ist, oder ob eine genetische Abweichung im Schwangerschaftsprodukt vorliegt.

Zur Abklärung einer elterlichen genetischen Prädisposition, wie zum Beispiel einer Translokation oder einer Inversion auf Autosomen oder Gonosomen, sollte bei den möglicherweise betroffenen Paaren eine genetische Beratung und eine Chromosomenanalyse veranlasst werden (Ward 2000, Strowitzki et al., 1996).

Im Hinblick auf die genetischen Veränderung des Schwangerschaftsproduktes kommen sowohl Chromosomenstörungen als auch den Schwangerschaftsverlauf beeinträchtigende Einzelgendefekte in Frage, wobei letztere vergleichsweise selten vorkommen (Ward 2000). Wie Untersuchungen am Abortgewebe zeigten, handelt es sich bei den überwiegenden Fällen um Chromosomenstörungen und zwar insbesondere aufgrund von chromosomalen Fehlverteilungen. Hierbei sind bestimmte Chromosomen prädestiniert, wie zum Beispiel das Chromosom 16. Am häufigsten tritt die Trisomie 16 auf, gefolgt von der gonosomalen Monosomie 45 X0 (Carp et al., 2001, Daniely et al., 1998). Diese Fehlverteilung resultiert von chromosomal veränderten Gameten. Dabei liegt die Präferenz deutlich bei der Eizelle. In Abhängigkeit vom Alter können bis zu 40% der Eizellen von einer Chromosomenstörung betroffen sein (Verlinsky et al., 1998, Verlinsky 1999), im Vergleich dazu nur 2-4% aller Spermien (Zenzes et al., 1992).

1.1.4. Infektionen

Lokale vaginale, zervikale oder uterine Infektionen sowie chronische virale Infektionen beeinträchtigen den komplikationslosen Verlauf einer Schwangerschaft. Meist wird der Einfluß aber erst jenseits des ersten Schwangerschaftsdrittels bedeutend (Flint und Gibb 1996).

Als mögliche, mit RSA assoziierte Erreger sind *Toxoplasma gondii*, *Chlamydia trachomatis*, Mykoplasmen, Ureaplasmen und andere anaerobe Keime zu nennen. Pathomechanistisch ist der Circulus vitiosus von Keimaszension, Infektion, Freisetzung von Entzündungsmediatoren und daraus resultierender erhöhter

Wehenbereitschaft sowie isthmozervikaler Insuffizienz anzunehmen (Strowitzki et al., 1996).

1.1.5. Uterine Veränderungen

Bei etwa 10% der unter wiederkehrenden Fehlgeburten leidenden Frauen sind uterine Veränderungen im Sinne von Müllerschen Fusionsanomalien als Ursache festzustellen (Yamada et al., 2001).

Am häufigsten findet sich der Uterus septus, wobei die Abortraten je nach Schweregrad der Anomalie zwischen 25-67% schwanken (Strowitzki et al., 1996, Forstner und Hricak 1994).

Submuköse und transmurale Myome können Komplikationen darstellen, besonders dann, wenn sie in die Uterushöhle ragen und damit die endometriale Funktion beeinträchtigen. Intrauterine Synechien können sowohl die Ursache als auch das Ergebnis wiederholter Aborte sein (Strowitzki et al., 1996).

Bedingt durch eine isthmozervikale Insuffizienz kann es zu einer stummen Öffnung des Muttermundes im zweiten oder dritten Trimenon kommen, häufig assoziiert mit der Problematik eines Amnioninfektionssyndroms (Strowitzki et al., 1996, Sailing 1984).

1.1.6. Endokrinologische Gesichtspunkte

Als wichtige endokrinologische Ursache gestörter Frühschwangerschaften ist das Syndrom der polyzystischen Ovarien (PCO) abzuklären. Nach Segal et al. (1988) liegt die Fehlgeburtsrate bei PCO-Patientinnen bei 30%. Ursächlich ist hierbei, daß die Betroffenen unter einer LH-Hypersekretion leiden (Regan et al., 1990). Da aufgrund des kompensatorisch gesenkten FSH-Spiegels eine adäquate Reifung der Eizelle nicht stattfindet, kommt es gehäuft zu frühen Fehlgeburten mit fehlender Herzaktion oder zu Windeiern. Die LH-Hypersekretion scheint also eine entscheidende Komponente bei wiederholten Schwangerschaftsverlusten zu sein (Strowitzki et al., 1996).

Untersuchungen zur Schilddrüsenfunktion zeigen ein vermehrtes Auftreten von Autoantikörpern gegen Thyreoglobulin bei RSA-Patientinnen. Diese Autoantikörper

sind als Hinweis auf ein generalisiert aktiviertes Autoimmunsystem zu werten, da meist keine Schilddrüsendysfunktion nachweisbar ist. Bei den Patientinnen mit Schilddrüsendysfunktion ist das Risiko für Abgänge auf das Doppelte erhöht (Matalon et al., 2001, Strowitzki et al., 1996). Weiterhin müssen eine Luteininsuffizienz, eine Hyperandrogenämie sowie eine Hyperprolaktinämie ausgeschlossen werden.

1.1.7. Autoimmunerkrankungen und Antiphospholipid-Syndrom (APS)

Erkrankungen wie der systemische Lupus erythematodes (SLE), das Sjögren-Syndrom, aber auch andere Kollagenosen und insbesondere das Antiphospholipid-Syndrom (APS) sind autoimmunologischen Ursachen.

Charakteristisch für das APS sind das Vorkommen von Antikörpern gegen das negativ geladene Phospholipid Cardiolipin (ACA) oder das Vorhandensein von Lupus-Antikoagulantien, welche als Autoantikörper auf noch ungeklärtem Weg Endothel und Thrombozyten aktivieren, eine verlängerte partielle Thromboplastinzeit (PTT) bedingen und somit zu Thrombosen führen (Greer 2000, Vaquero et al., 2001, Bender et al., 1998, Cowchock 1991).

Die Assoziation des APS mit wiederholten Spontanaborten ist anzunehmen, da bei bis zu 50% aller RSA-Patientinnen Antiphospholipid-Antikörper nachweisbar sind (Coumans et al., 1999) und zudem überzufällig häufig bei den Betroffenen Fibrinablagerungen und Mikrothromben im intervillösen Raum gefunden wurden (Matzner et al., 1994). Es resultiert eine verminderte Perfusion der uterinen Spiralarterien und des intervillösen Raums, was zur Durchblutungsstörung der Plazenta und der reifenden Frucht führt. Das Spektrum reicht hier von frühen bis zu späten missed abortion, plötzlichem intrauterinem Fruchttod und über starke Blutungsepisoden bis hin zu schwerster Plazentainsuffizienz (Vaquero et al., 2001).

1.1.8. Alloimmunologische Parameter

Es konnte gezeigt werden, daß ein Zusammenhang zwischen wiederholten Fehlgeburten und dem Trophoblast-Lymphozyten-kreuzreagierenden (TLX) Antigensystem besteht. Das bedeutet, daß sich bei RSA-Patientinnen vermehrt

zytotoxische Antikörper gegen die Lymphozyten ihrer Partner finden (Thaler 1992, Thaler 1996, Kovats et al., 1990).

Um eine ungestörte Entwicklung einer Schwangerschaft sicher zu stellen, muß die Immunantwort gegen TLX-Antigene spezifisch geregelt werden. Durch eine adäquate Produktion von anti-idiotypischen Antikörpern (das sind eigene Antikörper, die gegen die eigenen primären Antikörper gerichtet sind) kann die zytotoxische anti-TLX-Aktivität verhindert werden.

Wenn bei Patientinnen jedoch anti-paternale Antikörper zu finden sind, scheint eine fehlerhafte anti-idiotypische Regulation vorzuliegen. Folglich können rezidivierende Spontanaborte auch durch eine inadäquate anti-paternale Immunreaktion hervorgerufen werden, da sich diese möglicherweise auch gegen Trophoblastenzellen etc. richten kann (Thaler 1992, Thaler 1996).

1.1.9. Hämostaseologische Aspekte

Bei der Ursachenklärung rezidivierender Schwangerschaftsverluste müssen besonders hämostaseologische Parameter in Betracht gezogen werden (Sarto et al., 2000, Yamada et al., 2001). Von Bedeutung hierbei ist eine uterine Mikrozirkulationsstörung, worauf das Auffinden von Mikrothrombosen im Abortmaterial auch bei fehlendem Nachweis von Antiphospholipid-Antikörper hinweist.

Die thrombophilen Mutationen in den Genen des Faktor V (FV) und des Faktor II (FII) prädisponieren für Thrombosen im venösen Gefäßsystem und sind bereits seit längerem als ätiologische Komponente rezidivierender Früh- sowie Spätaborte bekannt (Pauer et al., 2000, Martinelli et al., 1998). Insbesondere die FV-Leiden-Mutation (FVL) ist mit dem Auftreten einer Plazentainsuffizienz und stark erhöhtem Thromboserisiko in fortgeschrittener Schwangerschaft assoziiert (Brenner et al., 1997, Pauer et al., 2000, Younis et al., 2000).

Auch bei einer Defizienz der fibrinstabilisierenden Faktoren XII und XIII wird ein erhöhtes Fehlgeburtsrisiko angenommen (Lane and Grant 2000, Ogarasawara et al., 2001). In Untersuchungen wurde bereits ein signifikant häufigeres Auftreten des Faktor XII-Mangels bei RSA-Patientinnen gezeigt (Yamada 2001, Kato et al., 2001, Bräulke et al., 1993). Da normalerweise der aktivierte Faktor XII den Plasminogen-

Aktivator-Inhibitor 1 (PAI-1) hemmt, kommt es bei einem Faktor XII-Mangel zu einer erhöhten PAI-1-Aktivität. Daraus resultiert eine verminderte Fibrinolyse und Verschiebung des Gleichgewichts zu Gunsten der Blutgerinnung mit vermehrten Fibrinablagerungen (Dyerberg et al., 1980). Es gelang bereits, einen signifikant höheren PAI-1-Spiegel bei RSA-Patientinnen nachzuweisen (Glueck et al., 2000, Sarto et al., 2000, Bräulke et al., 1993).

1.2. Hämostase und Fibrinolyse

1.2.1. Blutgerinnung

Bei einer Eröffnung von kleinen Blutgefäßen kommt es physiologischerweise zu dem im folgenden skizzierten Ablauf der Blutgerinnung. Sie stellt ein kompliziertes Zusammenspiel von vaskulären, zellulären und plasmatischen Vorgängen dar.

Die zunächst einsetzende *vaskuläre Blutstillung* wird hauptsächlich durch die aus den Thrombozyten freigesetzten Substanzen Serotonin, ADP, Adrenalin, Kollagen und plättchenaktivierender Faktor (PAF) bewerkstelligt. Es kommt zu einer reflektorischen Vasokonstriktion und damit zum Erliegen des Blutflusses.

Danach folgt die Phase der *zellulären Blutstillung*. Die freiliegenden subendothelialen Matrixproteine des Gefäßendothels führen durch Rezeptorbindung zur Anheftung der Thrombozyten an die verletzte Stelle. Dabei werden die Plättchen aktiviert, was zu mehreren Folgereaktionen führt. Sie aggregieren und verkleben untereinander (siehe Kap. 1.3.1). Der entstandene Thrombus ist aber noch instabil.

Im Zuge der anschließenden *plasmatischen Vorgänge*, welche die eigentliche Gerinnung darstellen, kommt es zum Einbau von fadenförmigem Fibrin in den Thrombus, wodurch eine ausreichende Festigkeit und irreversible Aggregation bewirkt wird.

Das Prinzip der Gerinnung besteht darin, daß das lösliche Fibrinogen durch Proteolyse in das unlösliche Fibrin umgewandelt wird. Die Abspaltung bestimmter Peptidreste aus dem Fibrinogen wird durch Thrombin katalysiert. Aktives Thrombin seinerseits entsteht wiederum aus der inaktiven Vorstufe Prothrombin (siehe Abb. 2).

Die Aktivierung kann über zwei Wege laufen, das *intrinsische* und das *extrinsische System*, wobei beide in eine gemeinsame Endstrecke münden.

Das extrinsische System erfordert weniger Schritte und ist in Sekundenschnelle aktiviert. Es verschließt das Gefäß von außen durch Gerinnung des ausgetretenen Blutes. Das intrinsische System bewirkt den Verschluss des Gefäßes durch Thrombusbildung quasi von innen. Es stellt eine Enzymkaskade dar, die durch Kontaktaktivierung in Gang kommt. Die Aktivierung der Kaskade dauert länger (Minuten) als die des extrinsischen Systems (Klinke et al., 1996, Löffler et al., 1997) .

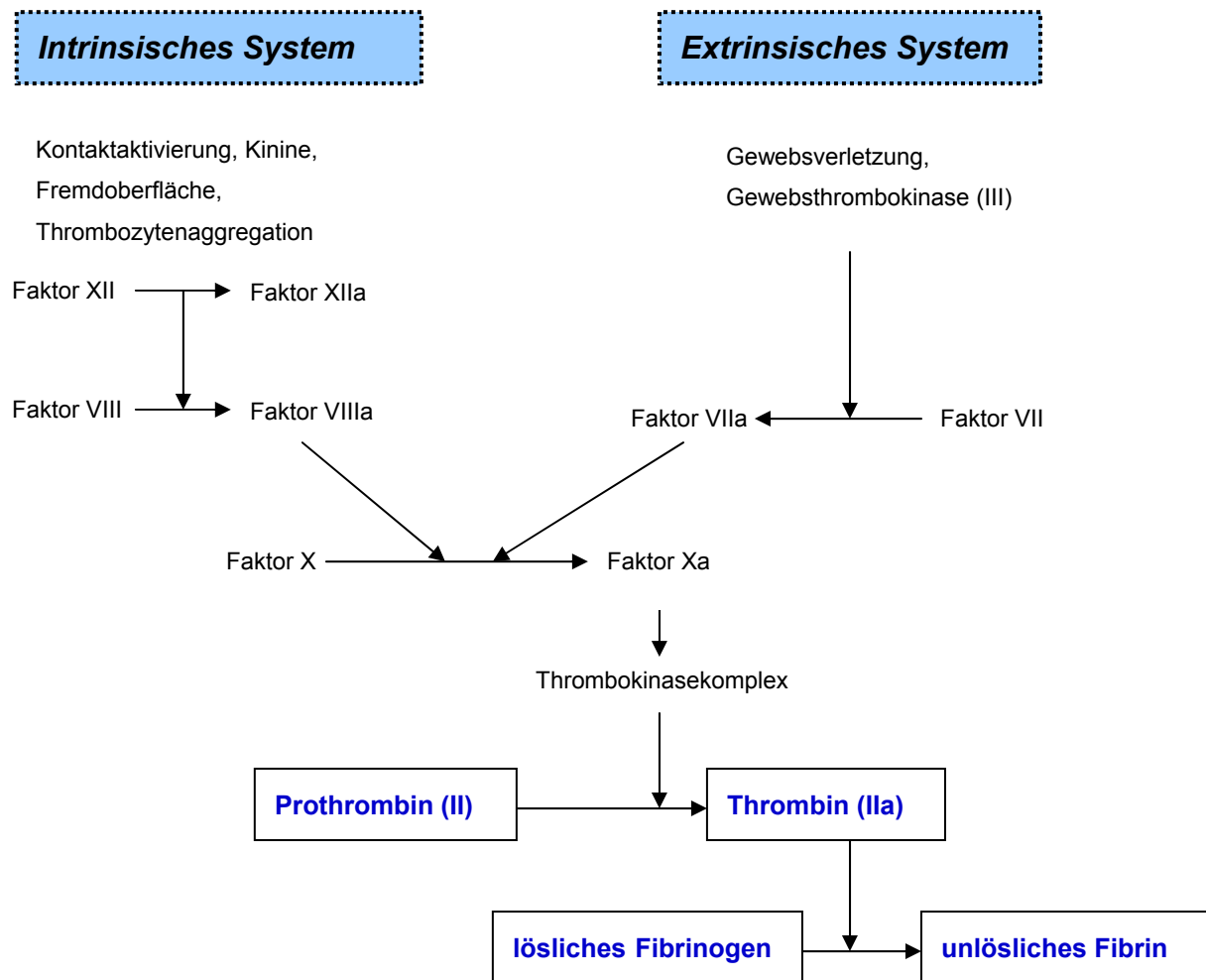


Abb. 2: Schema der Blutgerinnung

1.2.2. Fibrinolyse

Durch das Zusammenspiel der verschiedenen Komponenten des Hämostasesystems wird einerseits erreicht, daß ein Gerinnsel genügend Stabilität bekommt, um einen Gefäßwanddefekt zu verschließen; andererseits muss aber durch die Fibrinolyse gewährleistet werden, daß ein Fibringerinnsel langsam wieder abgebaut wird, um das Gefäß zu reperfundieren. Unter physiologischen Bedingungen herrscht ein funktionelles Gleichgewicht zwischen Blutgerinnung bzw. Fibrinbildung und der Fibrinolyse. Zur Aufrechterhaltung dieses Gleichgewichtes erfolgt eine Regulation und Kontrolle der Fibrinolyse durch Aktivatoren und Inhibitoren.

Das Prinzip der Fibrinolyse ist die Spaltung des Fibrins durch das proteolytische Enzym Plasmin. Dazu wird die Vorstufe Plasminogen, ein Plasmaglobulin, durch Plasminogenaktivatoren aktiviert und in Plasmin umgewandelt (siehe Abb. 3). Bei den Plasminogenaktivatoren lassen sich Gewebsaktivatoren (t-PA, Urokinase) und Plasmaaktivatoren (Faktor XIIa, Kallikrein, Streptokinase) unterscheiden. Das entstandene Plasmin ist in der Lage, Fibrin aufzulösen und damit eine weitere Thrombosierung zu verhindern (Klinke et al., 1996, Löffler et al., 1997).

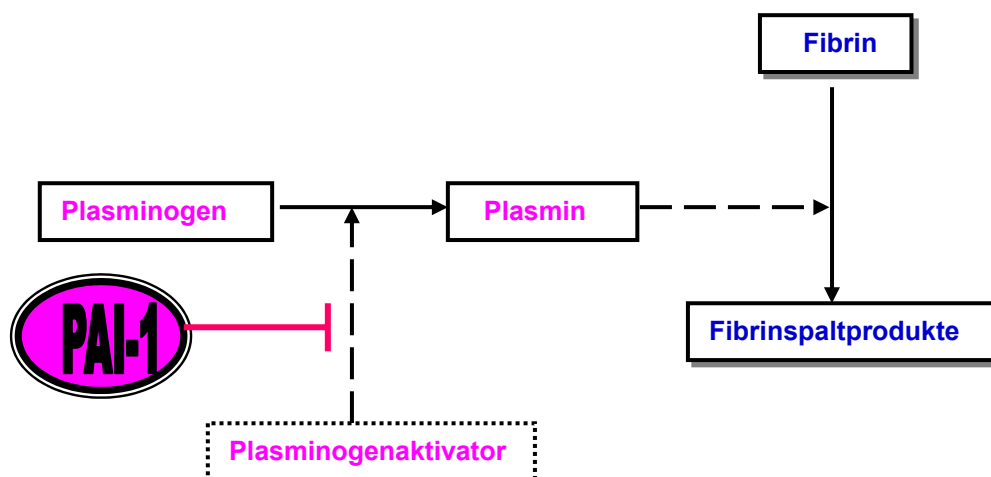


Abb. 3: Prinzip der Fibrinolyse

PAI-1 = Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1

1.2.2.1. Rolle des PAI-1 als Fibrinolyse-Inhibitor

Eine wichtige Kontrollfunktion der Plasmin-vermittelten proteolytischen Kaskade übernimmt der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1). Im Sinne einer schnellen Hemmung von Plasminogenaktivatoren (besonders t-PA und Urokinase) soll PAI-1 eine überschießende Proteolyse verhindern (siehe Abb. 3) (Schettler et al., 1998).

Bei Hyperaktivität des PAI-1 resultiert eine erniedrigte Plasminaktivität. Klinische Folge ist ein erhöhtes Thromboserisiko (Margaglione et al., 1994, Thorgersen et al., 1998). Bei einem herabgesetztem PAI-1-Spiegel kommt es andererseits aufgrund der gesteigerten Plasminaktivität zu einer Hyperfibrinolyse (siehe Tab. 2).

PAI-1 ↑	⇒	Plasminaktivität ↓	⇒	Thromboserisiko ↑
PAI-1 ↓	⇒	Plasminaktivität ↑	⇒	Fibrinolyse ↑

Tab. 2.: Auswirkungen der PAI-1-Aktivität

PAI-1 = Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1

1.2.2.2. Fibrinolyse und das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS)

Die endotheliale Expression von PAI-1 wird durch die Aktivität des PAI-1-Gens bestimmt, aber auch durch das Angiotensin-Converting Enzym (ACE) via dem Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) (Ridker et al., 1993, Kimura et al., 1998).

Die physiologische Interaktion zwischen dem RAAS und dem Fibrinolysesystem erfolgt über das Angiotensin II, welches den PAI-1-Plasmaspiegel erhöht, indem es die Produktion des PAI-1 in glatten Muskelzellen, Mesangiumzellen und Endothelzellen induziert (Fogo et Vaughan 1998, Feener et al., 1995).

Die Expression des Angiotensin II wiederum wird durch das Angiotensin-Converting Enzym (ACE) induziert. Das ACE wandelt dazu durch enzymatische Hydrolyse Angiotensin I in Angiotensin II um (siehe Abb. 4).

Eine verminderte Transkription von ACE bewirkt in der Folge der Kaskade eine verminderte PAI-1-Aktivität, eine erhöhte Plasminaktivität und damit eine gesteigerte Fibrinolyse (Kimura et al., 1998; siehe Tab.3). Andererseits führt ein erhöhter ACE-

Spiegel über einen erhöhten PAI-1-Spiegel und einer verminderten Plasminaktivität zu einem gesteigertem Thromboserisiko (Kimura et al., 1998; siehe Tab.3).

Die Interaktion des ACE und des PAI-1 nimmt folglich einen wichtigen Einfluss auf hämostaseologische Prozesse, wobei thrombotische und fibrinolytische Mechanismen zusammenwirken (Fogo et Vaughan 1998).

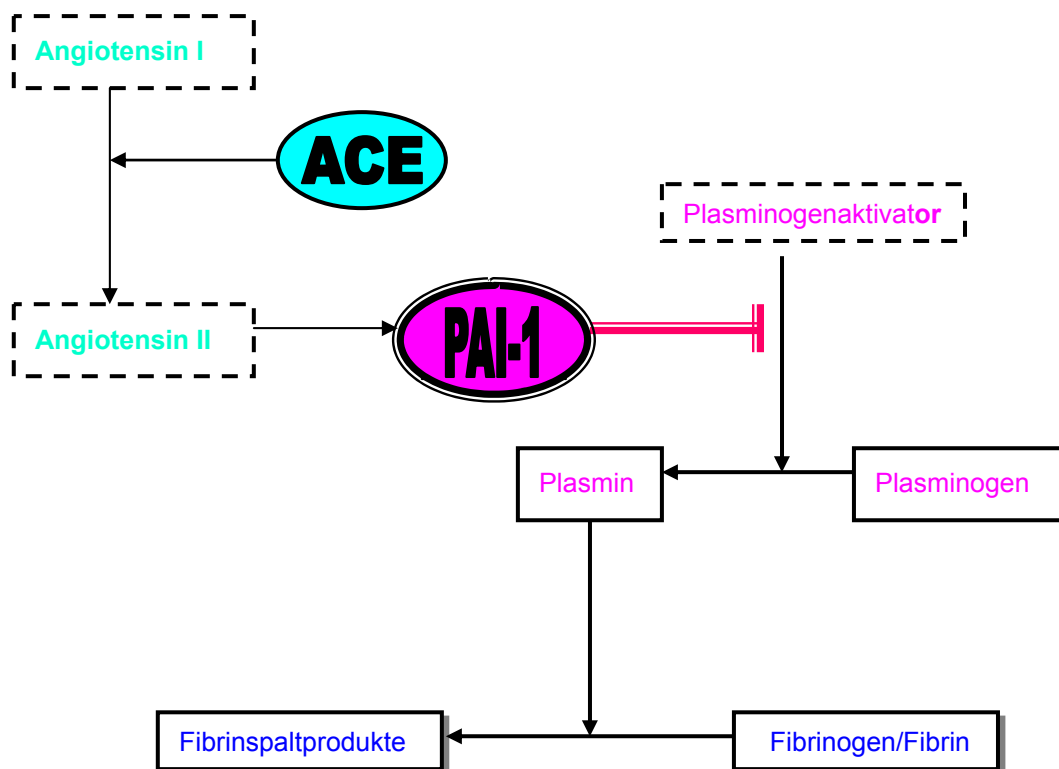


Abb. 4: Interaktion der Fibrinolyse mit dem RAAS und dem ACE

PAI-1 = Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1, ACE = Angiotensin-Converting Enzym

ACE ↑	PAI-1 ↑	⇒	Plasminaktivität ↓	⇒	Thromboserisiko ↑
ACE ↓	PAI-1 ↓	⇒	Plasminaktivität ↑	⇒	Fibrinolyse ↑

Tab. 3.: Auswirkungen der ACE-Aktivität

ACE = Angiotensin-Converting Enzym

1.2.3. Einfluß auf den Verlauf einer Schwangerschaft

Es herrscht ein funktionelles Gleichgewicht zwischen Blutgerinnung und Fibrinolyse. Die Aufrechterhaltung dieses Gleichgewichtes und die genaue Regulation thrombotischer und fibrinolytischer Aktivitäten ist für den komplikationslosen Verlauf einer Schwangerschaft nötig. Einerseits muss die Fibrinpolymerisation und damit die Stabilisierung der plazentaren Basalplatte erfolgen. Andererseits muss eine optimale Perfusion der intervillösen Räume und der plazentaren Strombahn sichergestellt werden.

Zusammenhänge zwischen Variationen in Genen der Gerinnungskaskade und venös-arteriellen thrombembolischen Defekten sind seit geraumer Zeit bekannt (Lane et Grant, 2000). Schwangerschaftsassozierte Probleme wie Präeklampsie, abruptio placentae, fetale Retardierung und Totgeburten in Verbindung mit intervillösen und spiralarteriellen Thrombosen sowie inadäquater plazentarer Perfusion wurden neuerdings ebenso beschrieben und stehen im Fokus aktueller Untersuchungen (Kupfermine et al., 2000). Bei Frauen mit derartigen Komplikationen lassen sich häufig Mutationen finden, die zu Thrombosen prädisponieren (Kupfermine et al., 1999, Blumenfeld et Brenner 1999, Pihusch et al., 2001).

Folglich scheint ein Schutz vor Thrombosierung sowie vor überschießender Fibrinolyse grundlegend für eine adäquate Entwicklung der feto-maternalen Einheit zu sein (Kupfermine et al., 2000).

1.3. Analyisierte Gerinnungsfaktoren

1.3.1. Glykoprotein IIIa (GPIIIa)

Das Glykoprotein IIIa ist, ebenso wie das Glykoprotein IIb, ein Membranrezeptor für Fibrinogen und den von-Willebrand-Faktor (vWF). Dieser Rezeptorkomplex ist auf Thrombozyten und Endothelzellen zu finden.

Durch intrazelluläre Botenstoffe (Adrenalin, Thrombin, Adenosindiphosphat (ADP), plättchenaktivierender Faktor (PAF)) werden die Thrombozyten aktiviert. Es resultiert die Umorganisation der thrombozytären Plasmamembran, was die Exposition des GPIIb/GPIIIa-Rezeptorkomplexes nach sich zieht. Das Fibrinogen kann nun an den Rezeptor binden. Benachbarte Thrombozyten werden so über Fibrinogen und den GPIIb/IIIa-Rezeptor verknüpft. Folglich sind GPIIIa sowie Fibrinogen bei der Thrombusentstehung beteiligt (siehe Abb. 5).

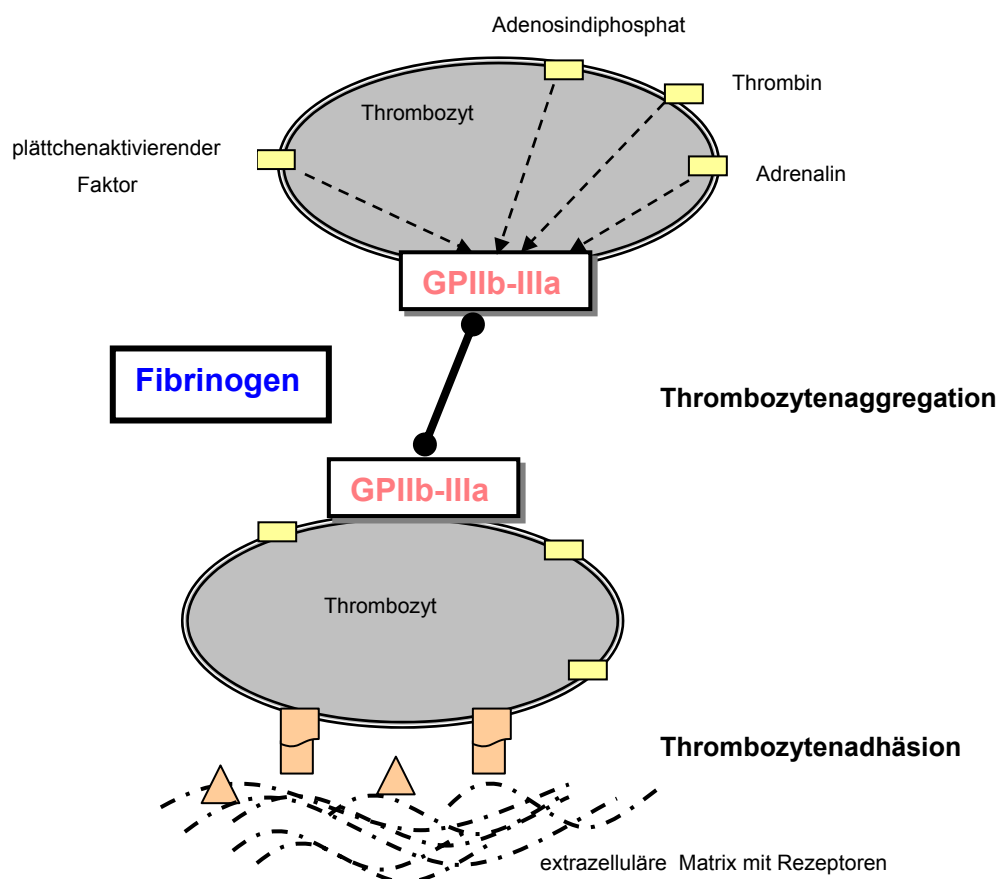


Abb. 5: Thrombozytenadhäsion und -aggregation

GP = Glykoprotein

1.3.1.1. GPIIIa-Gen

Das Glykoprotein GPIIIa, ein 90 kD-Polypeptid, und das Glykoprotein GPIIb werden von separaten, aber dennoch eng verbundenen Genen kodiert (Heidenreich et al., 1990). Strukturelle Unterschiede im GPIIb/GPIIIa-Rezeptor basieren auf

Polymorphismen in dem für GPIIIa kodierenden Gen, welche zu unterschiedlichen thrombozytären Aktivitäten führen. Man kennt bereits mehrere Polymorphismen, wovon eine C/T-Punktmutation im Exon 2 an Position 1565 im GPIIIa-Gen den Austausch der Aminosäure Leucin (Leu) durch Prolin (Pro) an Position 33 bewirkt. Es entstehen zwei Formen des GPIIIa, PIA₁ (Leu³³) und PIA₂ (Pro³³) (Cambien et al., 1992).

Die A₁-Allelfrequenz beträgt in Zentraleuropa 85% und die A₂-Allelfrequenz 15%, wobei diese in Abhängigkeit vom untersuchten Kulturkreis von 0,5% bis 26,5% differiert. Der A₁A₁-Genotyp tritt bei ca. 72% der mitteleuropäischen Bevölkerung auf, der A₂A₂-Genotyp hingegen nur bei 2% (Garcia et al., 1998, Hermann et al., 1997).

1.3.1.2. GPIIIa-Polymorphismus und thrombotische Komplikationen

Mehrere Untersuchungen, die die Auswirkungen dieses Polymorphismus untersucht haben, kommen zu unterschiedlichen Ergebnissen (Lane et al., 2000). Weiss et al. (1996) zeigte, daß das A₂-Allel mit gesteigertem Risiko für Myokardinfarkt und akuten Koronarthrombosen vergesellschaftet ist. Bei Koronarstenosen und koronarer Gefäßkrankheit konnte ebenso eine signifikante Erhöhung des A₂-Allels von Garcia-Ribes et al., (1998) nachgewiesen werden. Die Ergebnisse führten zur Annahme, dass das A₂-Allel zu einer erhöhten Thromboseneigung prädisponiert und als ein genetischer Risikofaktor für vaskuläre Gefäßkrankheiten anzusehen ist. Andere Arbeitsgruppen erhielten jedoch keine signifikanten Ergebnisse und konnten diese Zusammenhänge somit nicht bestätigen (Hermann et al., 1997, Ridker et al., 1997, Mamotte et al., 1998).

1.3.1.3. GPIIIa-Polymorphismus und RSA

Da das GPIIIa ein wichtiger Faktor bei der Thrombozytenaggregation ist und das A₂-Allel bereits als Risikofaktor für pathologische thrombotische Geschehen beschrieben wurde (Weiss et al., 1996, Garcia-Ribes et al., 1998), soll der Einfluß des A₁/A₂-Polymorphismus des GPIIIa-Gens auf wiederholte Fehlgeburten untersucht werden.

1.3.2. Beta-Fibrinogen (β F)

Das Fibrinogen ist zum einen bei der Blutgerinnung beteiligt. Aus dem löslichen Fibrinogen wird durch Proteolyse das unlösliche Fibrin. Folglich wird der Defektverschluß stabil. Zum anderen ist Fibrinogen, neben dem GPIIIa, wichtiger Bestandteil bei der Thrombozytenaggregation. Das Fibrinogen bindet an den GPIIb/GPIIIa-Rezeptor und führt so zu einer Aneinanderlagerung der Thrombozyten. Es entsteht ein Thrombozytenkonglomerat (siehe Kap.1.3.1. und Abb. 5).

1.3.2.1. Beta-Fibrinogen-Gen

Fibrinogen ist ein längliches Protein mit 340kD Molekulargewicht und zwei identischen Untereinheiten mit je drei Polypeptidketten ($A\alpha$, $\beta\beta$ und γ). Die Gene, die für die α -, β - und γ -Ketten kodieren, liegen in einem 50 kb-Segment auf dem langen Arm von Chromosom 4 (Margaglione et al., 1998b). Da ihre DNA-Sequenzen erhebliche Ähnlichkeiten aufweisen, liegt es nahe, daß die Gene durch Duplikation und anschließende Diversifikation eines gemeinsamen Vorläufers entstanden sind. Durch Thrombin werden von je zwei der Peptidketten (α,β) kleine Bruchstücke, die Fibrinopeptide A und B, abgespalten, wodurch im Fibrinogenmolekül Bezirke freigelegt werden, die eine Aneinanderlagerung der entstandenen Fibrinmonomere zu Polymeren erlauben (Thomas et al., 1991, Löffler et Petrides 1997).

Die meisten Untersuchungen haben sich auf das β -Fibrinogen konzentriert. Ein bekannter Polymorphismus ist die Basensubstitution eines Guanin (G) durch Adenin (A) an Position -455 in der Promoterregion des β -Gens (-455G/A-Polymorphismus). Dabei tritt das A-Allel mit einer Allelfrequenz von ungefähr 20% in der Bevölkerung (kulturelle Unterschiede sind zu berücksichtigen) deutlich seltener auf als das G-Allel (Humphries et al., 1997).

1.3.2.2. Beta-Fibrinogen-Polymorphismus und thrombotische Komplikationen

Es konnte gezeigt werden, dass Homozygotie für das A-Allel für konstant erhöhte Fibrinogenspiegel verantwortlich ist. Das A-Allel ist mit einer 1,2 bis 1,5 fach gesteigerten Transkriptionsrate und mit einem um 7-10% erhöhten Fibrinogen-Plasmaspiegel assoziiert (van der Bom et al., 1998). Die Folge ist eine verstärkte

Thrombozytenaggregation und damit eine gesteigerte Thromboseneigung. Demgemäss wurde das A-Allel auch als ein nicht unerheblicher Risikofaktor für Schlaganfall (Carter et al., 1997, Nishiuma 1998), zerebrovaskuläre Komplikationen (Kessler et al., 1997) und koronare Gefäßkrankheiten (Lane et Grant 2000, de Maat et al., 1998, Behague et al., 1996) deklariert.

1.3.2.3. Beta-Fibrinogen-Polymorphismus und RSA

Studien belegen, daß der G/A-Polymorphismus des β -Gens Mitverursacher von thrombophilen Problemen ist und damit ein erhöhtes Thromboserisiko in sich birgt. Dies hat die Frage aufgeworfen, ob dieser Polymorphismus auch eine Rolle bei der Entstehung rezidivierender Spontanaborte spielt. Ist ein bestimmter Genotyp bei der Thromboseentstehung bzw. bei der thrombophilen Dysregulation der RSA-Patientinnen beteiligt? Liegt vielleicht der homozygote AA-Genotyp im Vergleich zur Normalbevölkerung häufiger bei RSA-Patientinnen vor, da das A-Allel ein besonderes Risiko für Thrombosierung darstellt?

1.3.3. Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1)

1.3.3.1. PAI-1-Gen

Der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1) ist ein einkettiges Glykoprotein mit 55kD Molekulargewicht, welches zur Serin-Protease-Inhibitor-Superfamilie (SERPINS) gehört.

Das menschliche PAI-1 Gen ist auf dem langen Arm des Chromosom 7 (q21.3-q22) lokalisiert und enthält 9 Exons und 8 Introns. Es exprimiert zwei verschiedene Transkripte mit 2.3 kb und 3.2 kb Länge (Loskutoff et Samad 1998, Sartori et al., 1998). Nach der Synthese liegt es in einer aktiven Form vor, ist aber in Lösung instabil und zerfällt schnell in die inaktive, „latente“ Form. Diese kann durch denaturierende Moleküle wieder aktiviert werden. Im Thrombozyt liegt ungefähr 70-80% des PAI-1 in der latenten Form vor. Da PAI-1 im Plasma nur in niedriger Konzentration vorkommt, deutet die kurze Halbwertszeit im Blut (≤ 10 min.) auf eine hohe Biosynthese hin. Somit kann im Rahmen der Aufrechterhaltung des

physiologischen Gleichgewichts die Konzentration schnell verändert werden (Loskutoff et Samad 1998).

Das PAI-1-Gen enthält in der Promoterregion an Position –675 einen Insertions/Deletions-Polymorphismus. Es sind entweder vier oder fünf Guaninbasen vorhanden (4G/5G) (siehe Kap. 2.5.7.3). Die 4G-Allelfrequenz beträgt ca. 50% in der Bevölkerung, die Häufigkeit des 4G/4G-Genotyps liegt durchschnittlich bei ca. 25% (Ferrer-Antunes, 1998).

1.3.3.2. PAI-1-Polymorphismus und thrombotische Komplikationen

Die Transkriptionsrate von PAI-1 ist verstärkt beim Vorliegen des 4G-Allels, besonders in homozygoter Form. So führt die 4G/4G-Homozygotie zu einem 30% höheren PAI-1-Plasmaspiegel als bei 5G/5G-tragenden Individuen (Humphries et al., 1997, Sartori et al., 1998, Glueck et al., 2000b; siehe Abb. 6).

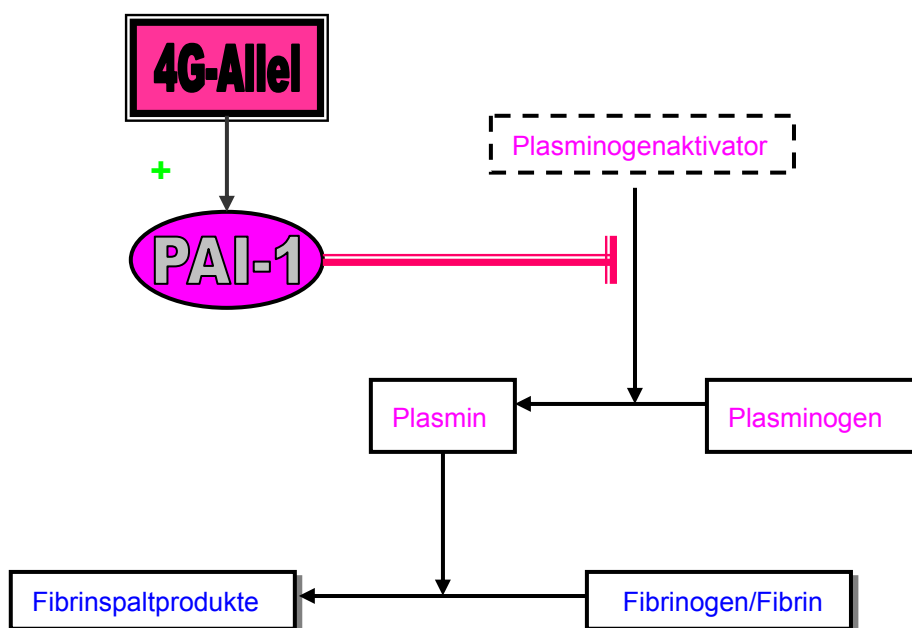


Abb. 6: Einfluß des PAI-4G-Allels auf die PAI-1-Aktivität

PAI-1 = Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1

Aufgrund der resultierenden reduzierten Plasminaktivität ist das Thromboserisiko erheblich gesteigert (siehe Tab. 4).

4G/4G	PAI-1 ↑	⇒	Plasminaktivität ↓	⇒	Thromboserisiko ↑
5G/5G	PAI-1 ↓	⇒	Plasminaktivität ↑	⇒	Fibrinolyse ↑

Tab. 4: Auswirkungen der PAI-1-4G/5G-Genotypen auf die Plasminaktivität

PAI-1 = Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1

Für das 4G-Allel wurden bereits Assoziationen mit Myokardinfarkten, KHK und tiefen Venenthrombosen auf der Basis einer reduzierten Fibrinolyse und damit einer erhöhten Thromboseneigung, beschrieben (Ferrer-Antunes 1998, Gardemann et al., 1999, Iacoviello et al., 1998). Daher geht man davon aus, dass es sich bei dem 4G-Allels um einen thrombembolischen Risikofaktor handelt.

1.3.3.3. PAI-1-Polymorphismus und RSA

Auf einen möglichen Zusammenhang zwischen dem PAI-1-Polymorphismus und rezidivierenden Spontanaborten scheinen folgende Tatsachen hinzudeuten: Zum einen soll es bei Vorliegen des 4G-Allels zu vermehrten thrombembolischen Komplikationen kommen. Zum anderen wurde über erhöhte fibrinolytische Plasmaparameter, wie u.a. dem PAI-1-Plasmaspiegel, bei Frauen mit unerklärlichen Frühaborten berichtet, was auf eine fibrinolytische Dysregulation oder thrombophile Defekte hindeuten könnte (Sarto et al., 2000, Glueck et al., 2000). Ebenfalls richtungsweisend könnte das gehäufte Auftreten des Faktor XII-Mangels bei RSA-Patientinnen sein (Yamada et al., 2000, Kato et al., 2001; siehe Kap. 1.1.9). Signifikant erhöhte PAI-1-Werte, die im Rahmen des fibrinolytischen Geschehens bei Vorliegen dieses Defektes entstehen, konnten bereits bei betroffenen RSA-Patientinnen nachgewiesen werden (Bräulke et al., 1993, Glueck et al., 2000, Sarto et al., 2000).

Anlässlich dieser Überlegungen wurden die Genotypen des PAI-4G/5G-Polymorphismus bestimmt und deren Verteilung zwischen RSA-Patientinnen und Kontrollen untersucht.

1.3.4. Angiotensin-Converting Enzym (ACE)

1.3.4.1. ACE-Gen

Das **Angiotensin-Converting Enzym (ACE)** ist eine Dipeptidylcarboxypeptidase mit 150kD Molekulargewicht. Das menschliche Enzym ist in der Plasmamembran von glatten Muskelzellen und Endothelzellen verankert. Kodiert wird es von einem auf Chromosom 10 gelegenen Gen, welches offensichtlich aus der Duplikation eines Vorläufergens hervorgeht, da es zwei alternative Promotoren aufweist (Rigat et al., 1990; Rieder et al., 1999; siehe Abb. 7). Unter Benützung des 5'-gelegenen Promotors entsteht das **somatische ACE**, welches *zwei* funktionelle Domänen mit je einem aktiven Zentrum enthält. Es wird vor allem in der Lunge synthetisiert. Außerdem gibt es noch ein **Keimzell-ACE**, welches mittels des zweiten Promotors in reifen Spermatisden exprimiert wird. Diese ACE-Form verfügt nur über *ein* aktives Zentrum (Rigat et al., 1990; Rieder et al., 1999).

Im Plasma lässt sich nur eine geringe Aktivität des ACE nachweisen.

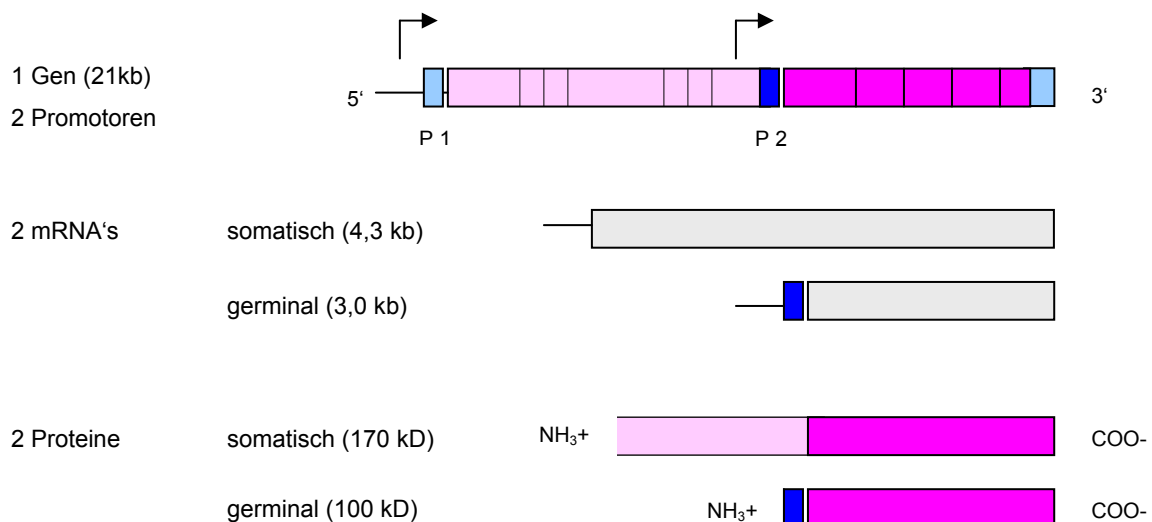


Abb. 7: ACE-Genstruktur, Transkription und Prozessierung.

Gen mit zwei potentiellen Promotoren, deren jeweilige Transkriptionsprodukte für somatisches oder germinales ACE codieren (Löffler et al., 1997);

mRNA = messenger RNA, kD = Kilodalton, kb = Kilobasen

In Intron 16 des ACE-Gens ist ein Deletions/Insertions-Polymorphismus (D/I) bekannt, wobei die Insertionssequenz 300 Basenpaare besitzt (Tiret et al., 1992). Die Frequenz des D/D-Genotyps in der Bevölkerung beträgt 13-35% in Abhängigkeit vom untersuchten Kulturkreis (Margaglione et al., 1997).

1.3.4.2. ACE-Polymorphismus und thrombotische Komplikationen

Ein Vorliegen des D-Allels bedingt einen erhöhten ACE-Plasmaspiegel, welcher dann indirekt via Angiotensin II zu einer verstärkten PAI-1-Aktivität führt. Es resultiert eine reduzierte Plasminaktivität und demzufolge ein erhöhtes Thromboserisiko. (Margaglione et al., 1997, Ferrer-Antunes 1998; siehe Abb. 8 und Tab. 5).

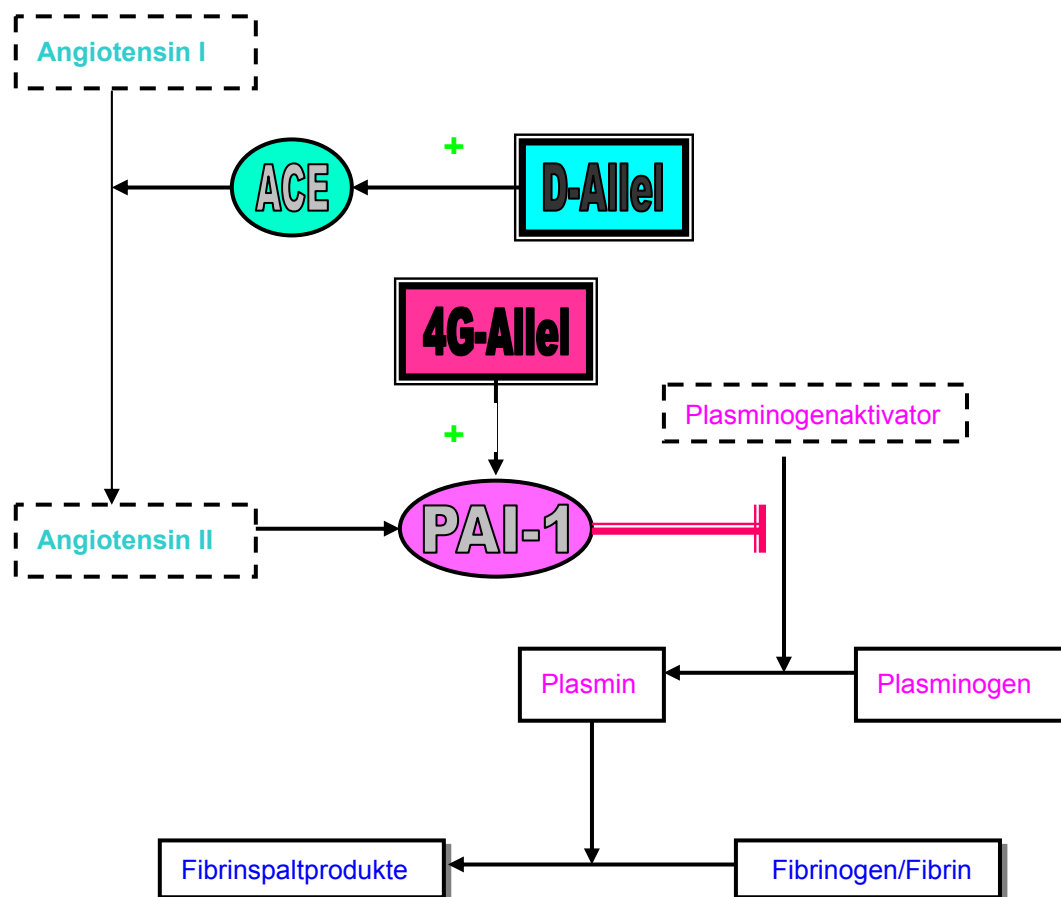


Abb. 8: Einfluß des ACE-D-Allels auf die PAI-1-Aktivität

PAI-1 = Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1, ACE = Angiotensin-Converting Enzym

ACE-D/D	PAI-1 ↑	⇒	Plasminaktivität ↓	⇒	Thromboserisiko ↑
ACE- I/I	PAI-1 ↓	⇒	Plasminaktivität ↑	⇒	Fibrinolyse ↑

Tab. 5: Auswirkungen der ACE-D/D- und I/I-Genotypen auf die PAI-1-Aktivität

ACE = Angiotensin-Converting Enzym

Der D/D-Genotyp nimmt also ebenfalls Einfluss auf die Entstehung von thrombembolischen Prozessen. Dies bestätigt auch das gehäufte Auftreten von Myokardinfarkten (Margaglione et al., 1997) bei Vorliegen dieses Genotyps.

1.3.4.3. ACE-Polymorphismus und RSA

Fatini et al. wiesen darauf hin, dass Polymorphismen des Renin-Angiotensin-Systems mögliche prädiktive Marker für Schwangerschaftskomplikationen sein könnten und hoben dabei den ACE-D/D-Genotyp als besonderen Risikofaktor für Schwangerschaftsverluste hervor (Fatini et al., 2000). Weiterhin wurde ein Zusammenhang des D/D-Genotyps mit schwangerschaftsinduzierter Hypertonie beschrieben (Kupfermine et al., 2000, Zhu et al., 1998).

Im Hinblick auf unsere RSA-Patientinnen könnte somit der D/I-Polymorphismus auch auf die im intervillösen Raum stattfindenden thrombotischen und fibrinolytischen Ereignisse Einfluss nehmen.

1.3.5. Interaktion des ACE- und PAI-1-Polymorphismus

Es ist bekannt und aus den bisherigen Erläuterungen geht hervor, dass sowohl der ACE-D/D-Genotyp als auch der PAI-1-4G/4G-Genotyp trotz unterschiedlicher Angriffspunkte, synergistisch zu einer erhöhten PAI-1-Plasmaaktivität führen (Kim et al., 1997, Kimura et al., 1998; siehe Abb. 8).

In der Literatur wurde bereits bei einem doppelt homozygoten Genotyp (ACE-D/D in Kombination mit PAI-1-4G/4G) über ein vermehrtes Auftreten von Makroangiopathien sowie renale und kardiovaskuläre Komplikationen berichtet (Margaglione et al., 1997, Fogo et Vaugh 1998, Wong et al., 2000). Bisher zeichneten sich jedoch nur

Tendenzen ab (Margaglione et al., 1997). Eine statistische Signifikanz wurde nur bei der diabetischen Nephropathie erreicht (Wong et al., 2000).

In Widerspruch dazu stehen Untersuchungen, die ein Zusammenwirken des ACE-Genotyps und der PAI-1-Aktivität bestreiten (Jeng et al., 1998, Seino et al., 1998).

Auf diesen Vorkenntnissen basierend, untersuchten wir, ob die Kombination aus dem ACE- und dem PAI-1-Polymorphismus Einfluß auf wiederkehrende Spontanaborte nimmt.

1.3.6. Abortmechanismen

Der Verlauf rezidivierender Fehlgeburten gestaltet sich oft sehr unterschiedlich. Die Ursachen eines Schwangerschaftsverlustes können vielfältig sein, so kommen unter anderem Blutungskomplikationen, Mikrozirkulationsstörungen bzw. erhöhte Thromboseneigung, Anlagestörungen, Infektionen und genetisch determinierte Ursachen in Betracht. Vermehrte Blutungen sowie Blutungsstörungen lassen sich im Zusammenhang mit einem Abortus incompletus beobachten. Mikrozirkulationsstörungen und übermäßige Thrombenbildung werden als pathogenetische Ursache für missed abortion und intrauterinen Fruchttod (IUFT) diskutiert. Einem Abortivei, auch Windei genannt, liegt zumeist eine Anlagestörung zugrunde. Beim Abortivei handelt es sich um ein fehlentwickeltes Ei mit verkümmerter oder fehlender Embryonalanlage (Stauber et Weyerstahl, 2001). Infolge einer mangelhaften Ausbildung der Zottengefäße geht die Embryonalanlage zugrunde, während Trophoblast und Eihüllen noch einige Tage erhalten bleiben (Martius et al., 1996). Infektionen können zu einem vorzeitigem Blasensprung bzw. premature rupture of the membranes (PROM) führen. Im Hinblick auf genetisch determinierte Abortursachen finden sich überwiegend embryonale Chromosomenstörungen, insbesondere aufgrund von chromosomalen Fehlverteilungen (Carp et al., 2001, Daniely et al., 1998).

Soweit eruierbar, wurden die jeweiligen Abortursachen erfasst, registriert und pathogenetisch vergleichbare Gruppen für die einzelnen Abortmechanismen gebildet (siehe Kap. 2.2.). Danach untersuchten wir, ob bestimmte Abortmechanismen mit bestimmten Genotypen assoziiert sind. Nachdem sowohl der PAI-1-Polymorphismus als auch der ACE-Polymorphismus entscheidende thrombophile Einflussfaktoren zu

sein schienen, wurden die Abortmechanismen mit den PAI-1-4G/5G-Genotypen und den ACE-D/I-Genotypen korreliert.

1.4. Fragestellungen dieser Arbeit

1. Treten die analysierten Polymorphismen bei Patientinnen mit rezidivierenden Spontanaborten im Vergleich zu den Kontrollpatientinnen seltener oder häufiger auf?
2. Welchen Einfluss hat die Kombination synergistisch wirkender Polymorphismen auf wiederholte Fehlgeburten, analysiert am Beispiel der Polymorphismen des ACE-Gens und des PAI-1-Gens?
3. Wie häufig sind die einzelnen Abortmechanismen in unserem Kollektiv?
4. Liegt eine Korrelation zwischen den Abortmechanismen und den Genotypen des PAI-1-4G/5G-Polymorphismus und des ACE-D/I-Polymorphismus vor?

2. Material und Methoden

2.1. Patienten- und Kontrollkollektiv

2.1.1. Patientenkollektiv

Die Studiengruppe umfasst 102 Patientinnen mit rezidivierenden Spontanaborten (RSA) „ohne fassbare“ Ursache, die sich zwischen 1996 und 2000 in der RSA-Spezialsprechstunde vorstellten. Es wurden Patientinnen eingeschlossen, die zwei oder mehr konsekutive Spontanaborte vor vollendeter 24. Schwangerschaftswoche (SSW) erlitten hatten. Dabei wurde differenziert, ob es sich um primäre RSA handelt, das heißt, die wiederholten Aborte vor einer regelhaften Geburt auftraten, oder anderenfalls um sekundäre RSA. Zudem wurde dokumentiert, ob die aufeinanderfolgenden Fehlgeburten ausschließlich im ersten Trimenon (≤ 12 .SSW) oder innerhalb des zweiten Trimenons auftraten.

Um ein Kollektiv mit Patientinnen zu erhalten, deren Spontanaborte unklarer Genese sind, wurden die Betroffenen und ihre Partner auf das Vorliegen relevanter ursächlicher Parameter untersucht (siehe Kap. 1.1.2.). Uterine Abnormalitäten, die den regelhaften Verlauf einer Schwangerschaft beeinträchtigen können, wurden mittels gynäkologischer Untersuchung und vaginalem Ultraschall abgeklärt. Nach genetischer Beratung wurden Chromosomenanalysen der Frauen und derer Partner zum Ausschluss von Chromosomenstörungen durchgeführt. Der Hormonstatus wurde durch die Bestimmung von TSH, Prolaktin, DHEA-S und Testosteron überprüft. Die üblichen Normbereiche mussten eingehalten sein (TSH: 0,3-4 mU/l, Prolaktin: < 30 ng/ml, DHEA-S: 0,3-4,3 µg/l, Testosteron: 0,2-1 ng/ml). Hämostaseologisch mussten die als Risikofaktoren bekannten Gerinnungsparameter ATIII (80-130%), Protein C (70-140%) und Protein S (50-120%) innerhalb der in Klammern angegebenen Normgrenzen liegen. Lupus-Antikörper durften nicht nachweisbar sein (Coumans et al., 1999, Sarto 2000). Um autoimmunologische Ursachen, insbesondere das Antiphospholipid-Syndrom, auszuschließen, wurden die **Anticardiolipin-Antikörper** Typ IgM (**ACA IgM**) und IgG (**ACA IgG**), die **Dilute Russell**

Viper Venom Time (DRVVT) und die Lupus-sensitive aPTT ermittelt (Greer 2000, Vaquero et al., 2001). Dabei durften IgM-Anticardiolipin-Antikörper 6 GPL-U/ml mit einer Kontrolle im Abstand von 6 Wochen und ACA-IgG 12 GPL-U/ml ebenfalls mit einer Kontrolle nach 6 Wochen nicht überschreiten. Der DRVVT-Test und die Lupus-sensitive aPTT mußten negativ sein. Weiter wurden die **Antinukleären Antikörper (ANA)** bestimmt, welche unter 1:120 liegen mussten.

Alle erhobenen Daten wurden in einen, für jeden Patienten vorbereiteten, Datenerfassungsbogen eingetragen (siehe Kap. 6.1. Datenerfassungsbogen). Konnten keine der aufgeführten systemischen Ursachen für die wiederholten Fehlgeburten gefunden werden, so wurden die Betroffenen in das Patientenkollektiv und damit in unsere Studie eingeschlossen.

Alle Patientinnen und auch die Probandinnen der Kontrollgruppe wurden ausführlich über das Studienkonzept und die Untersuchungen aufgeklärt und gaben ihr schriftliches Einverständnis. Die Analysen wurden entsprechend den Kriterien der Deklaration von Helsinki und derer Novellierungen von Tokio, Hongkong und Somerset West durchgeführt.

2.1.2. Kontrollkollektiv

Die Kontrollgruppe besteht aus 128 gesunden Probandinnen. Die Frauen mussten mindestens eine unauffällige Termingeburt nach komplikationslosem Schwangerschaftsverlauf haben. Zudem durften keine Fehlgeburten und auch keine Abnormalitäten des Kindes vorliegen.

2.2. Gruppenbildung der unterschiedlichen Abortmechanismen

Der jeden Abort kennzeichnende Mechanismus wurde registriert und in die zugehörige Gruppe eingeordnet. Wir bildeten nach pathogenetischen Gesichtspunkten Gruppen für Blutungskomplikation/Abortus incompletus (bei verstärkten Blutungen), missed abortion/intrauteriner Fruchttod (mit Verdacht auf Mikrozirkulationsstörung und erhöhte Thromboseneigung), Abortivei (mit Verdacht auf Anlagestörung), premature rupture of the membranes (PROM) bzw. vorzeitiger

Blasensprung (mit Verdacht auf Infektion) sowie für embryonale Chromosomenstörung (siehe Kap. 1.3.6.).

Bei der Datensammlung stützten wir uns auf die Patientenakten mit den anamnestisch erhobenen Angaben und, soweit verfügbar, auf unterstützendes Material wie Arztbriefe, histologische Untersuchungen, Mutterpass, Ultraschallbilder etc.. Die Befunde wurden in den, im Anhang dargestellten, Datenerfassungsbogen eingetragen (siehe Kap. 6.1. Datenerfassungsbogen). Die Fehlgeburten, für die aufgrund von fehlenden und nicht eruierbaren Angaben keine Einteilung vorgenommen werden konnte, wurden der Auswertung entzogen.

Die Gruppenbildung diente, um Zusammenhänge zwischen den analysierten Genmutationen und den aufgetretenen Abortursachen erkennen zu können. Im Zusammenhang mit einer hypo- bzw. hyperfibrinolytischen Wirkung waren für uns der Polymorphismus im PAI-1-Gen und im ACE-Gen von besonderem Interesse. Nachdem beide Polymorphismen entscheidende hämostaseologische Einflussfaktoren zu sein schienen, wurden die Abortmechanismen mit den PAI-1-4G/5G-Genotypen und den ACE-D/I-Genotypen korreliert.

2.3. Die Polymerasekettenreaktion

Bei der Polymerasekettenreaktion (polymerase chain reaction = **PCR**) handelt es sich um eine relativ einfache und schnelle Methode, eine genau definierte DNA-Sequenz millionenfach zu vervielfältigen (amplifizieren). Sie ist jedoch keine „Endlosreaktion“, da durch die immer größer werdende DNA-Menge eine Hemmung der Enzymaktivität auftritt und der Substratverbrauch der Reaktion ebenfalls ein Ende setzt (Sambrook et al., 1989, Saiki 1988).

Zur Untersuchung von genetischen Polymorphismen ist die PCR das „Mittel der Wahl“, weshalb sie auch als Methodik für die Analysen dieser Arbeit gewählt wurde.

2.3.1. Grundprinzip der PCR

Zur Durchführung der PCR ist es nötig, die Sequenz eines kurzen DNA-Abschnittes an jedem Ende des interessierenden Fragmentes, das amplifiziert werden soll, zu

kennen. Zu diesen werden spezifische komplementäre Oligonukleotide (sog. Primer) synthetisiert. Die Methode besteht aus sich wiederholenden Zyklen von DNA-Denaturierung in Einzelstränge, Primer-Annealing und DNA-Elongation/DNA-Extension.

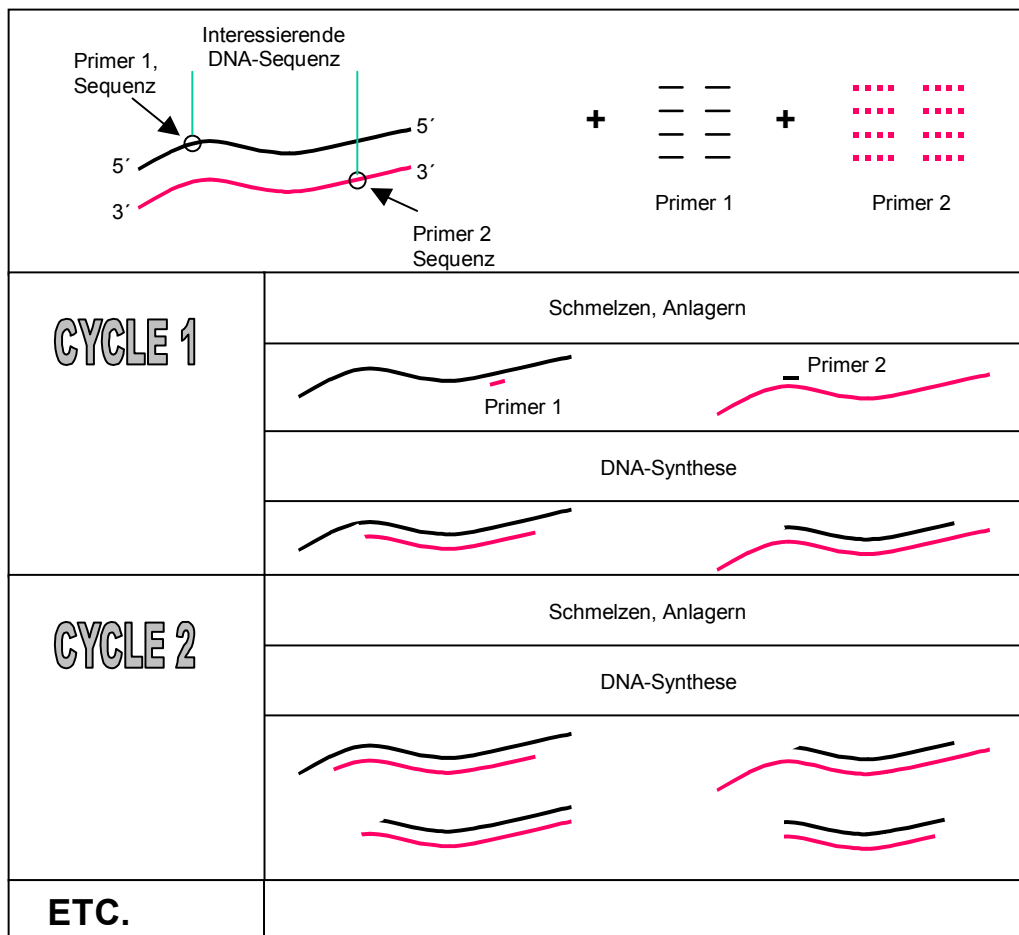


Abb. 9 : Polymerasekettenreaktion nach Abbas et al. 1994

Zunächst werden zu der doppelsträngigen DNA die zwei einzelsträngigen Primer (DNA-Oligonukleotide) gegeben, welche gegenläufig orientiert sind. Die PCR beginnt dann mit dem Auftrennen des DNA-Doppelstranges in Einzelstränge durch Erhitzen auf 94-95°C (Denaturierungsphase). Anschließend folgt eine Abkühlung auf 55 - 70°C, was die Einzelstränge erhält und die Anlagerung der im Überschuss vorhandenen Primer an ihre komplementäre Sequenz erlaubt ("Annealing"). Bei der Temperatur von 72°C dienen die soeben entstandenen Doppelstrangstücke der DNA-Polymerase als Anfangspunkte der "Primerverlängerung" aus den ebenfalls im Überschuss zugegebenen Desoxyribonukleotidtriphosphaten (A,T,G,C), wobei der

DNA-Einzelstrang als Matrize ("template") dient (Elongation/Extension). Es entsteht ein komplementäres Gegenstück zu dem ursprünglich einzelsträngigen DNA-Template (siehe Abb. 9). Dieser Zyklus wird 30-35 mal wiederholt. Die nach mehreren Zyklen entstandenen Produkte werden in der folgenden Amplifikationsrunde selbst als Matrizen dienen, wodurch es zu einer exponentiellen Vermehrung eines doppelsträngigen DNA-Fragments kommt. Abschließend folgt eine längere Extension und Abkühlung des Reaktionsgemisches auf 4°C.

Die PCR läuft in einem *Thermocycler* ab, der für die Einzelschritte optimale Reaktionstemperaturen liefert. Zudem wird eine thermostabile DNA-Polymerase aus dem Bakterium "Thermus aquaticus" (Taq-Polymerase) verwendet, damit das Enzym die Hitzedenaturierung übersteht (Sambrook et al., 1989).

2.3.2. Vor- und Nachteile der PCR

Kennzeichnend für die PCR sind die 3 "S": *Selektivität, Spezifität, Speed*.

Die einfache Handhabung der Methode, die hohe Erfolgsrate bei relativ geringem organisatorischen und finanziellen Aufwand sowie die *Geschwindigkeit* sind wesentliche Vorteile der PCR. Zudem ist sie ein molekularbiologisches Verfahren, das minimalste DNA-Mengen zuverlässig nachweisen kann.

Die *Sensitivität* der Technik stellt einen Vor- und Nachteil zugleich dar: Der Vorteil liegt in der Möglichkeit, ein einziges gesuchtes Molekül aus 10^5 bis 10^6 anderen zu finden und zu amplifizieren (Saiki 1989). Gleichzeitig bringt die hohe Sensitivität jedoch auch mit sich, dass die PCR für Kontaminationen extrem anfällig ist. Deshalb ist es zwingend notwendig, Vorsichtsmassnahmen zur Kontaminationsvermeidung einzuhalten und ausgewählte Positiv- und Negativkontrollen mitzuführen (siehe Kap. 2.5.5. und 2.5.6.).

Ein kritisch zu betrachtender Faktor ist die *Präzision*. Die Taq-Polymerase weist eine hohe Fehlerrate insbesondere für Frameshift-Fehler auf (3'→5'-Exonukleaseaktivität der Taq-Polymerase mit einer Fehlerrate von 1/9000 für die Substitution von einzelnen Basenpaaren und von 1/41000 für Frameshift-Fehler). Die Fehlerrate hängt stark von der Enzymkonzentration und der Konzentration der Desoxyribonukleinsäuren ab (Tindall et al., 1988).

Durch hohe Annealingtemperaturen und hohe Elongationtemperaturen reduziert sich die Häufigkeit des “misprimings” (Fehlanlagerung), wodurch die Spezifität erhöht wird. Um die Bildung unspezifischer Nebenprodukte gering zu halten, wurde für jeden analysierten Gerinnungsfaktor ein optimiertes PCR-Protokoll erarbeitet (siehe Kap. 2.5.3.).

2.4. Material

2.4.1. DNA

Die aus EDTA-Vollblut isolierte DNA kann bei 4°C langfristig gelagert werden. Damit steht die DNA jederzeit zur Diagnostik zur Verfügung, was gerade für wissenschaftliche Studien von großem Nutzen ist.

Voraussetzung ist jedoch, dass die DNA in einem kontaminationsfreien Zustand vorliegt. Durch eine Verunreinigung mit Fremd-DNA oder PCR-Produkten wird das Ergebnis einer PCR verfälscht. Zur Vermeidung einer Kontamination sind deshalb entsprechende Vorsichtsmaßnahmen einzuhalten (siehe Kap.2.5.6.).

2.4.2. Oligonukleotidprimer

Das Prinzip der PCR beruht auf einer selektiven Amplifizierung eines beliebigen DNA-Abschnittes durch die DNA-Polymerase (siehe Kap. 2.3.). Dazu ist es nötig, dass man die Nukleotidsequenz der Randbereiche des DNA-Abschnittes kennt. Zwei Nukleotideinzelstränge mit einer Kettenlänge von 17-24 Nukleotiden, die man als „Primer“ bezeichnet, werden komplementär zu den Sequenzen dieser Randbereiche (flanking regions) chemisch synthetisiert (siehe Kap. 2.5.2.).

Man benötigt einen Oligonukleotidstrang am 5'-Ende des zu amplifizierenden Fragments und einen an dessen 3'-Ende. Die Oligonukleotide weisen also mit ihren 3'-Enden aufeinander zu, so dass nun die DNA zwischen den Primern repliziert werden kann. Bei Erreichen ihrer „Annealing“-Temperatur hybridisieren beide hochspezifisch mit ihren komplementären Sequenzen. Sie dienen dann als gegenläufige Startermoleküle für die DNA-Polymerase bei der DNA-Synthese. Man nennt sie auch “**forward primer**” und “**reverse primer**” (Sambrook et al., 1989).

Die eingesetzten Primer dürfen zueinander nicht komplementär sein, da sie sonst untereinander „Primer-Paare“ bilden. Die Oligonukleotideinzelstränge sollten ein möglichst ausgewogenes GC/AT-Basenverhältnis haben. Zudem sollte der gesamte Guanin(G)- und Cytosin(C)-Anteil bei 45-55% liegen, um durch eine hohe Anlagerungstemperatur eine hohe Spezifität erlangen zu können (Creighton 1999).

Die optimale Primer-Konzentration liegt zwischen 0,1 bis 1 µM. Höhere Konzentrationen führen zu „mispriming“ (Fehlanlagerungen) und zur Generierung unerwünschter Fragmente; zu niedrige Konzentrationen reduzieren die Effizienz der PCR (Saiki 1989).

Das Einführen definierter künstlicher Schnittstellen für eine bestimmte Restriktionsendonuklease in die Oligonukleotidsequenz (durch Veränderung einzelner Nukleotide in der DNA-Sequenz) mit nachfolgendem Restriktionsverdau und elektrophoretischer Auftrennung macht es möglich zu unterscheiden, ob eine Mutation vorliegt oder nicht. Hierauf beruht beispielsweise der Nachweis des 4G/5G-Polymorphismus im PAI-1-Gen.

Primer	Primerart	5'→3' Orientierung	Basenlänge	%GC
PAI 1-1	forward primer	AGCCCTCAGGGGCACAGAGAGAGT	34	65
PAI 1-2	reverse primer	CTGGCCACGT TCTAGGTTTTGTCTGTCTAGGACTTG GGGCCA	32	50
GPI-1	forward primer	TCTTAGCTATTGGGAAGTGGTAGG	24	46
GPI-2	reverse primer	ACCTTGTGCTCTATGCCCCAC	20	55
βF-1	forward primer	ATTTGGGAATGCAATCTCTGCTAC	24	42
βF-2	reverse primer	CTCCTCATTGTCGTTGACACCTT	23	48
ACE-1	forward primer	CTGGAGACCACTCCCATCCTTTCT	24	64
ACE-2	reverse primer	GATGTGGCCATCACATTCGTCAGAT	25	48
ACE-3	forward primer	TGGGACCACAGCGCCCGCCACTAC	24	71
ACE-4	reverse primer	TCGCCAGCCCTCCCATGCCCATAA	24	63

Tab.6: Verwendete Oligonukleotidprimer im Überblick

PAI = Plasminogen-Aktivator-Inhibitor, GP = Glykoprotein, βF = Beta-Fibrinogen, ACE = Angiotensin-Converting Enzym
%GC = prozentualer Basenanteil an Guanin und Cytosin

2.4.3. Chemikalien

Synthese der Oligonukleotidprimer

Ammoniak	29%ig
Tris-EDTA-Puffer : (TE-Puffer)	10mM Tris-HCl (pH 7,5) 1mM EDTA

Tab. 7: Zur Synthese der Oligonukleotidprimer benötigte Chemikalien

Präparation genomischer DNA

QIAamp Blood Mini Kit enthält:	QIAamp Spin Columns QIAGEN-Prtease Elutionspuffer AE Lysispuffer AL Waschpuffer AW 1 / AW 2
--------------------------------	---

Tab. 8: Bestandteile des QIAamp Blood Mini Kit

PCR

10 x Polymerase-Reaktionspuffer	100mM Tris-HCl (pH 8,3 bei 25°C) 500mM KCl 15mM MgCl ₂ 0,01% Gelatine	
dNTP	200µM dATP, dCTP, dGTP, dTTP	Lagerung bei –20°C
Eis-Äthanol	99,9%ig	Lagerung bei –20°C
Ficoll-Auftragpuffer	25% Ficoll 0,25% Bromphenolblau 0,25% Xylencyanol	
10x TBE-Marathon-Puffer	1,35M Tris 25mM EDTA 0,45M Borsäure	
Agarose	Gelier-Temp.: 36°C-42°C Sulfat: < 0,35%	kühl und trocken lagern
Ethidiumbromid	0,5 µg/ml	höchst mutagen
LMP-Agarose	Gelier-Temp.: 30°C Schmelztemp.: 65°C Sulfat: <0,10%	Low Melting Point
DNA Molecular Weight Marker	in: 10mM Tris-HCl (pH 7,5) 50mM NaCl 0,1mM EDTA	1 kb- Marker (Fragmentgröße: 75 bis 12216 bp)

Tab. 9: Zusammensetzung und Besonderheiten bei der PCR benötigter Chemikalien

Puffer für Restriktionsendonukleasen

NEBuffer 2 (für Hae III)	10 mM Tris-HCl 10 mM MgCl ₂ 50 mM NaCl 1 mM Dithiothreitol (pH 7,9 bei 25°C)
NEBuffer 3 (für Bsl I)	50 mM Tris-HCl 10 mM MgCl ₂ 100 mM NaCl 1 mM Dithiothreitol (pH 7,9 bei 25°C)
Puffer L (für Msp I)	100 mM Tris-HCl 100 mM MgCl ₂ 10 mM Dithioerythritol (pH 7,5 bei 37°C)

Tab. 10: Zusammensetzung der Puffer für die Restriktionsendonuklease**2.4.4. Enzyme****Taq-DNA Polymerase**

Konzentration:	5 units/μl
Lagerung:	-20 °C
Pufferzusammensetzung:	20 mM Tris-HCl (pH 8,0) 100 mM KCl 0,1 mM EDTA 1 mM DTT 0,5 % Tween 20 0,5 % Igepal CA-630 50 % Glycerol
Anmerkungen:	gereinigte, thermostabile DNA-Polymerase des thermophilen Bakteriums "Thermus aquaticus".

Tab.11: Zusammensetzung und Eigenschaften der Taq-DNA Polymerase**Restriktionsenzyme**

Bsl I	benötigter Puffer:	NEBuffer 3
	Bestimmung von:	PAI-1 4G/5G
	Erkennungsstelle:	5'...CCNNNNN*NNGG...3' 3'...GGNN*NNNNNCC...5'
	Lagerung:	-20°C
Msp I	benötigter Puffer:	Puffer L
	Bestimmung von:	Glykoprotein IIIa A ₁ /A ₂
	Erkennungsstelle:	5'...C*CGG...3' 3'...GGC*C...5'
	Lagerung:	-20°C
Hae III	benötigter Puffer:	NEBuffer 2
	Bestimmung von:	β-Fibrinogen -455 G/A
	Erkennungsstelle:	5'...GG*CC...3' 3'...CC*GG...5'
	Lagerung:	-20°C

Tab. 12: Eigenschaften der Restriktionsenzyme Bsl I, Msp I und Hae III

2.4.5. Herstellernachweis der Chemikalien und Geräte

Präparation genomischer DNA

2 ml - Reaktionsgefäß	Eppendorf, Hamburg
Na ₂ -EDTA	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Proteinase K	QIAGEN, Hilden
QiaAmp Blood Mini Kit	QIAGEN, Hilden

Synthese der Oligonukleotid-Primer

DNA-Synthesizer (Ein-Säulen-Gerät)	Perkin Elmer Applied Biosystems, Weiterstadt
NAP TM -5-Säulen	Pharmacia Biotech, Freiburg
Photometer UVIKON 810	Kontron Analytik GmbH, Eching b. München

Prä-PCR

1,5 ml - Reaktionsgefäß für Aliquots	Sarstedt AG, Nümbrecht
Gilson-Pipetten	ABIMED Analysen-Technik GmbH, Langenfeld
Tischzentrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg
QiaAmp Blood Mini Kit	QIAGEN, Hilden

PCR

PCR-Reaktionsgefäß	Biozym, Hess. Oldendorf
Peltier-Thermocycler, PTC-225, MJ Research	Biozym, Hess. Oldendorf
10x Polymerase-Reaktionspuffer	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DMSO	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
dNTP	Pharmacia Biotech, Freiburg
Taq-DNA Polymerase	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Restriktionsendonukleasen mit Puffer

Bsl I / NEBuffer 3	New England Biolabs, Bad Schwalbach/Taunus
Hae III / NEBuffer 2	New England Biolabs, Bad Schwalbach/Taunus
Msp I / Puffer L	Boehringer Mannheim

Post-PCR

Gilson-Pipetten	ABIMED Analysen-Technik GmbH, Langenfeld
Kühlzentrifuge Mikro Rapid/K	Hettich, Tuttlingen
Tischzentrifuge TD TM X Centrifuge	Abbott Diagnostics Division, Illinois USA
Vakuumzentrifuge (Speed-Vac)	Bachofer, Reutlingen
Gelträger	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Elektrophoresekammern	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Spannungsgeräte	LKB, Bromma
Transilluminator IL 305 M	Bachofer, Reutlingen
Agarose	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DNA Molecular Weight Marker	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich, Deisenhofen

Ficoll	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
LMP-Agarose (Low Melting Point)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Tris (Trishydroxymethylaminomethan)	Merck, Darmstadt
Xylencyanol	Merck, Darmstadt

Tab.13: Herstellernachweis der Chemikalien und Geräte, geordnet nach den Arbeitsphasen

2.5. Methoden

2.5.1. Präparation genomischer DNA aus EDTA-Vollblut

Aus den abgenommenen 2 ml Na₂-EDTA-Vollblut wird zunächst entsprechend den Herstellerangaben die genomische DNA mittels Ionenaustauscher-Chromatographie unter Verwendung des QIAamp Blood Mini Kits präpariert.

In einem 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß wird zu 200 µl Na₂-EDTA-Patientenvollblut mit ca. 10⁷ Zellen das gleiche Volumen an Lysispuffer-AL hinzupipettiert. Der Lysispuffer dient zum Auflösen der Zellmembranen. Nach Mischen und Anzentrifugieren folgt der Proteinverdau. Hierbei werden jeweils 25 µl QIAGEN-Protease pro 200 µl Ansatz hinzugefügt und anschließend 10 min. im Wasserbad bei 70°C inkubiert. Danach wird die Probe mit 210 µl reinstem Ethanol vermischt. Das gesamte Volumen (jedoch max. 600 µl in einem Schritt) wird auf eine zentrifugierbare QIAamp-Chromatographiesäule geladen und 1 min. bei 8000 $\frac{U}{min}$ zentrifugiert. Dabei wird die DNA von der Silikamembran der QIAamp-Säule adsorbiert. Zur Beseitigung von Verunreinigungen wird anschließend mit 500 µl Waschpuffer AW 1 gewaschen und 1 min. bei 8000 $\frac{U}{min}$ zentrifugiert. Das Filtrat wird verworfen. Ein Waschschrift mit Puffer AW 2 und dreiminütiges Zentrifugieren bei 14000 $\frac{U}{min}$ folgt. Die Säule wird anschließend in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gesetzt und mit 200 µl Elutionspuffer AE gespült, was zum Ablösen der an die Silikamembran gebundenen DNA dient. Abschließend wird nochmals 1 min bei 8000 $\frac{U}{min}$ zentrifugiert (QIAamp Blood Mini Kit and QIAamp Tissue Kit Handbook 01/97). Die so präparierte genomische DNA steht nun für die PCR zur Verfügung oder kann bei 4°C gelagert werden.

2.5.2. Synthese der Oligonukleotidprimer

Zur Herstellung der Oligonukleotid-Primer wird ein Oligo-Synthesizer (Ein-Säulen-Gerät) benutzt. Nachdem die Oligonukleotide an das Säulenmaterial gebunden sind, werden die Schutzgruppen (Acetylgruppen am 5'-Ende, Isobutyrylgruppen an G und T, Benzoylgruppen an den exozyklischen Aminen von A und C) abgespalten. Dazu erfolgt eine 8-stündige Inkubation bei 55°C in 3 ml Ammoniak, welcher nach Ablauf der Inkubationszeit verdampft wird. Die Primer werden nach Lyophilisation (Gefriertrocknung) in 500 µl TE-Puffer resuspendiert und mittels Gelfiltration über NapTM5-Säulen entsalzt. Man eluiert danach 1 ml TE. Anschließend misst man am Photometer bei 260nm die Extinktion und bestimmt die Oligonukleotidkonzentration:

$$\text{Konzentration } [\text{ng}/\mu\text{l}] = E_{\lambda 260} \times 30 \times \text{Verdünnungsfaktor} .$$

2.5.3. Optimierung der PCR

Mit dem Ziel, eine optimale Ausbeute an amplifizierten PCR-Produkten zu erhalten und größtmögliche Sensitivität und Spezifität zu erlangen, wurden Annealing-Temperatur, Dauer der einzelnen Reaktionsschritte und Zykluszahl der zu amplifizierenden Region der genomischen DNA angepasst (siehe Tab. 14).

	PAI-1			β-Fibrinogen		
PCR-Schritte	Temp.	Dauer	Zyklen	Temp.	Dauer	Zyklen
Initial	95°C	3 min.		95°C	3 min.	
Denaturierung	95°C	30 sec.	35	95°C	30 sec.	35
Annealing	72°C	1 min.		62°C	30 sec.	
Extension				72°C	1 min.	
Abschlussexension	72°C	2 min.		72°C	2 min.	
	GP IIIa			ACE		
PCR-Schritte	Temp.	Dauer	Zyklen	Temp.	Dauer	Zyklen
Initial	95°C	3 min.		95°C	3 min.	
Denaturierung	95°C	30 sec.	40	95°C	20 sec.	40
Annealing	59°C	30 sec.		56°C	30 sec.	
Extension	72°C	30 sec.		72°C	30 sec.	
Abschlussexension	72°C	2 min.		72°C	2 min.	

Tab.14 : Übersicht über Temperaturschema, Dauer und Zykluszahl der untersuchten Faktoren

Zur Optimierung der Effizienz wurde beim PCR-Ansatz die verwendete Menge DNA auf 3 µl herabgesetzt. So wird Material gespart und für mögliche weitere Bestimmungen aufgehoben. Das verwendete, optimierte PCR-Protokoll ist in Abb. 10 dargestellt.

3 µl	DNA (90-150 ng)
5 µl	10x Reaktionspuffer
5 µl	dNTP-Mix (125µM)
1 µl	forward primer (20µM)
1 µl	reverse primer (20µM)
0,25 µl	Taq-Polymerase
34,75 µl	Aqua bidest.
<hr/>	
50,00 µl	Gesamtvolumen

Abb.10 : Das verwendete PCR-Protokoll

2.5.4. Arbeitsschritte zur Durchführung der PCR

PCR-Ansatz

Zuerst wird ein "Master-Mix" in einem 2 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß angesetzt, dessen Volumen der Anzahl der Proben plus der Positiv- und Negativkontrolle und einer zusätzlichen Probe, die den Pipettierverlust ausgleichen soll, entspricht.

Für jede Probe pipettiert man 47 µl Master-Mix und 3 µl DNA in ein PCR-Gefäß, um das Reaktionsvolumen von 50 µl zu erreichen. Nach Mischen und Anzentrifugieren stellt man die Ansätze zur Durchführung der PCR in den Thermocycler und es wird das jeweils für den zu amplifizierenden Genabschnitt geeignete Programm, das die optimalen Reaktionsbedingungen liefert, eingegeben.

Umfällen der PCR

Um mit den PCR-Produkten weitere Post-PCR-Arbeitsschritte durchführen zu können, muss die DNA zunächst ausgefällt werden. Dazu werden zu jeder Probe (nicht jedoch zur Negativkontrolle) 2,5 µl 4M NaCl und 125 µl Eisäthanol (-20°C) zugegeben. Die Präzipitation der DNA geschieht durch die Bindung der positiv geladenen Salzionen an die Phosphatgruppen der Nukleinsäuren und durch den folgenden Wasserentzug, der durch die Zugabe von Äthanol erfolgt. Anschließend kühlt man die Proben 30 Minuten bei -80°C herunter. Durch die folgende 30-minütige

Zentrifugation bei 4°C und 12 000 U_{\min} in der Kühlzentrifuge pelletiert die DNA, so dass der Überstand abgekippt und verworfen werden kann. Um das entstandene DNA-Präzipitat vollständig zu trocknen, werden die Proben anschließend kurz in eine Vakuumzentrifuge gestellt.

Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die im Prokaryonten zur Abwehr von eingedrungener Fremd-DNA dienen. Diese Enzyme sind aber auch für die Molekularbiologie ein äußerst nützliches Instrument, da sie doppelstr nge DNA an definierten Sequenzen erkennen und schneiden. Diese Erkennungssequenzen besitzen in der Regel eine Länge von 4-8 Nukleotiden und sind für die jeweiligen Restriktionsenzyme hoch spezifisch (Schnittstellensequenz siehe Kap. 2.4.4, Tab. 12). Sie spalten die Phosphodiesterbindungen der DNA hydrolytisch, wodurch ein 3'-Hydroxy- und ein 5'-Phosphat-Ende entsteht.

Mit Hilfe des Restriktionsverdaus ist es auch möglich, bekannte Polymorphismen bzw. Mutationen nachzuweisen, durch die eine Schnittstelle verloren gegangen oder neu entstanden ist (Restriktionsfragment-Längenpolymorphismus-Analyse). Dazu werden die für die Mutation spezifischen Restriktionsenzyme und die zugehörigen Puffer zu dem DNA-Präzipitat nach folgendem Schema pipettiert:

1 μ l	Restriktionsenzym
1 μ l	zugehöriger Restriktionspuffer
8 μ l	H ₂ O
<hr/>	
10 μ l	Gesamtvolumen

Abb. 11 : Anleitung zum Restriktionsverdau

Nach Mischen und Anzentrifugieren werden die Proben gemäß den Herstellerempfehlungen bei der empfohlenen Temperatur inkubiert.

	Restriktionsenzym	zugehöriger Puffer	Inkubationszeit und – temp.
PAI-1	Bsl I	NEBuffer 3	55°C, über Nacht
GP IIIa	Msp I	Puffer L	37°C, >4h
β -Fibrinogen	Hae III	NEBuffer 2	37°C, >4h

Tab.15 : Übersicht über Restriktionsenzyme, Puffer und Inkubationsbedingungen

PAI-1: Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1, GP IIIa: Glykoprotein IIIa

Agarose-Gelelektrophorese zur Charakterisierung der PCR-Produkte

Der Restriktionsverdau liefert DNA-Fragmente unterschiedlicher Größe, die gelelektrophoretisch aufgetrennt und sichtbar gemacht werden können. Die Standard-Methode zur Charakterisierung der PCR-Produkte ist die Agarose-Gelelektrophorese. Dabei wandern die DNA-Fragmente im elektrischen Feld aufgrund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen vom Minus- zum Pluspol. Die Lage der Produkte im Gel kann nach Färbung mit Ethidiumbromid unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die Größe der aufgetrennten Fragmente kann durch Vergleich mit dem gleichzeitig mitgelaufenen Größenmarker abgeschätzt werden.

Für eine Trennung von etwas größeren Fragmenten (bis 800 bp) wird 1,5 %ige oder 2 %ige Agarose verwendet. Für kleine Fragmente wird 2 %ige oder 3 %ige LMP-Agarose (**low melting point**) benutzt, welche eine bessere Auflösung bietet, jedoch auch teurer ist.

	Agarose
PAI-1	2% LMP-Agarose
GP IIIa	3% LMP-Agarose
β-Fibrinogen	2% Agarose
ACE	1,5% Agarose

Tab.16 : Verwendete Agarosen

PAI-1: Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1, GP IIIa: Glykoprotein IIIa, ACE: Angiotensin-Converting Enzym

Herstellung des Agarose-Gels

Die in TBE-Puffer eingewogene Agarose wird unter mehrmaligem Schwenken in einem Mikrowellenherd aufgekocht, bis sie klar wird und keine Schlieren mehr bildet. Danach gießt man die flüssige Agarose in einen mit Tesafilm abgeklebten Gelträger, wobei darauf zu achten ist, dass keine Luftblasen entstehen. An einer Seite des Trays wird ein entsprechender Kamm eingesetzt, der die Taschen für die PCR-Produkte aussparen soll. Dann lässt man die Agaroselösung zu einem Gel abkühlen und der Kamm wird vorsichtig herausgezogen. Anschließend wird das Tray mit dem erstarrten Gel in die passende Elektrophoresekammer gesetzt und mit TBE-Puffer überschichtet.

Laden des Agarose-Gels

Die PCR-Produkte und die Negativkontrolle werden mit jeweils 2 µl Ficoll-Auftragepuffer versetzt, der das Aufschwemmen der Proben beim Laden verhindern soll. Dann werden die 12 µl in die vorgeformte Geltasche einer "lane" (Bahn) geladen. Die äußere Spur ist für den Größenmarker reserviert. Danach wird je nach Gelgröße eine Stromstärke zwischen 40 - 100 mA angelegt.

Nach erfolgter Gelelektrophorese wird die DNA im Ethidiumbromidbad unter entsprechenden Vorsichtsmaßnahmen wenige Minuten gefärbt. Ethidiumbromid ist ein im UV-Licht fluoreszierender Farbstoff, der durch Interkalation in die DNA 200fach stärker fluoresziert, wodurch die DNA sichtbar gemacht wird (Creighton 1999).

Photodokumentation

Die Darstellung der angefärbten DNA erfolgt auf einem UV-Transilluminator mit $\lambda=302$ nm. Zur Dokumentation wird mittels einer Kamera bei geeigneter Blende und Belichtungszeit ein Bild des Gels angefertigt.

2.5.5. Mitführen von Positiv- und Negativkontrollen**Negativkontrolle**

Es muss bei jedem Versuchsansatz überprüft werden, ob Produkt- oder DNA-Verunreinigungen die Ergebnisse verfälschen. Aus diesem Grund wird bei jeder PCR eine Negativkontrolle (=Reagenzienkontrolle) mitgeführt. Da die Probe alle Komponenten außer der DNA (statt dessen H₂O) enthält, darf keine Bande entstehen. Ist dennoch eine Bande zu sehen, so ist dies ein Hinweis auf eine erfolgte Kontamination.

Positivkontrolle

Um bei der Durchführung systematische und zufällige Fehler auszuschließen, wird bei jedem Versuchsansatz eine Positivkontrolle mitgeführt. Diese Positivkontrolle enthält die DNA eines Patienten mit einem bekannten Genotyp (z.B. PAI-5G/5G), dessen PCR-Produkte komplett verdaut werden.

Es wurden ausschließlich die Versuchsansätze in die Auswertung einbezogen, bei denen die erwartete Bandenkonstellation in der Positivkontrolle zu sehen war.

2.5.6. Vorsichtsmaßnahmen zur Kontaminationsvermeidung

Die PCR ist aufgrund ihrer hohen Sensitivität eine Methode, die für eine Kontaminierung extrem anfällig ist. Deshalb ist es wichtig, entsprechende Vorsichtsmaßnahmen einzuhalten.

Zunächst erfolgt eine Aliquotierung der Reagenzien. Daher kann man im Falle einer Verunreinigung zum einen die Kontaminationsquelle leichter auffinden und zum anderen bleibt der verursachte Schaden gering.

Vor Gebrauch müssen die benötigten Reagenzien sowie die Reaktionsgefäße mit der DNA kurz zentrifugiert werden, um den Kontaminationsweg über die Verschlusskappe zu verhindern. Die Deckelinnenseite darf nicht berührt werden.

Weiterhin wird eine strenge räumliche Trennung von Prä- und Post-PCR-Phase eingehalten, das heißt, das Ansetzen der PCR und das weitere Bearbeiten der fertigen PCR-Produkte wird in verschiedenen Räumen durchgeführt.

In jeder PCR-Phase sind zudem eigene Pipetten zu verwenden. Für Arbeitsschritte mit genomischer DNA stehen separate Pipetten zur Verfügung.

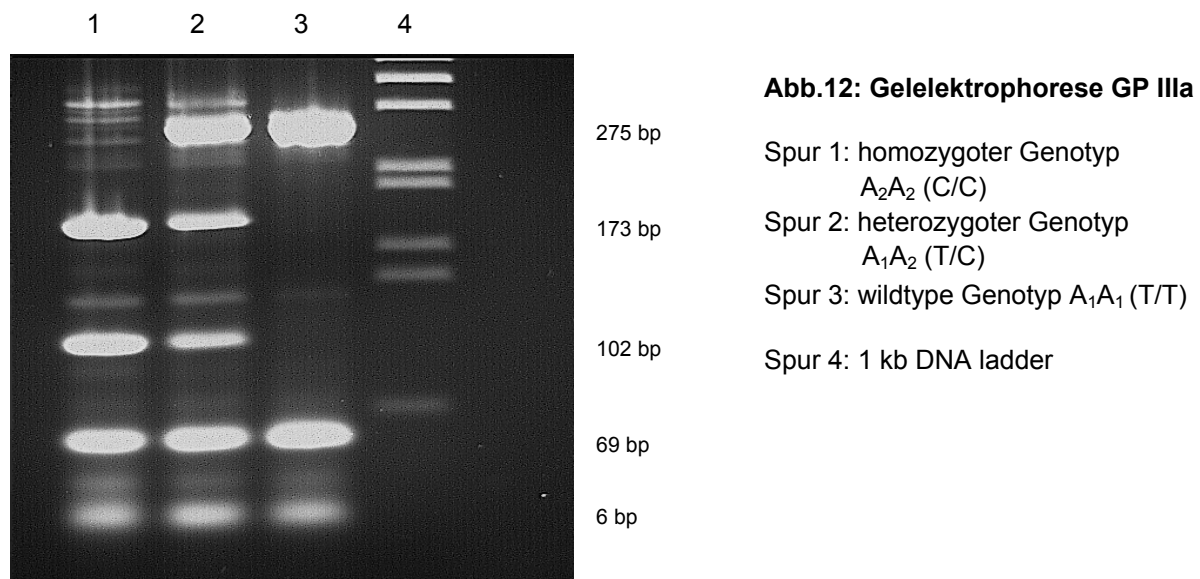
Die Gebrauch von Einwegpipettenspitzen ist selbstverständlich. In der Prä-PCR-Phase sind die Pipettenspitzen zusätzlich mit einem Aerosolfilter versehen, um die Verschmutzung der Pipette sowie die Verunreinigung des Reaktionsansatzes zu minimieren.

Bei sämtlichen Arbeiten sind Einmalhandschuhe zu tragen, wobei ein häufiger Handschuhwechsel erfolgen sollte, insbesondere dann, wenn Kontakt mit DNA bestand.

2.5.7. Analyse der Polymorphismen

2.5.7.1. Glykoprotein IIIa (GP IIIa)

Bei dem untersuchten PIA₁/PIA₂-Polymorphismus handelt es sich um eine C/T-Punktmutation der Base 1565 im GP IIIa-Gen.



Für die PCR werden die Primer GPI-1 und GPI-2 eingesetzt. Damit die hydrolytische Spaltung der DNA durch das Restriktionsenzym Msp I korrekt ablaufen kann, wird der Puffer L verwendet und die anschließende Inkubation gemäß den Herstellerempfehlungen bei 37°C für mehr als 4 Stunden durchgeführt. Die Auftrennung der Produkte erfolgt in 3% LMP-Agarose, da die erwarteten Banden in der Größenordnung zwischen 275 und 6 bp liegen (siehe Abb. 12).

Der Genotyp A_2A_2 wird als Positivkontrolle mitgeführt, da nur hier ein vollständiger Verdau des Amplifikationsproduktes erfolgt.

2.5.7.2. Beta-Fibrinogen (β F)

Bei dem Polymorphismus des β -Fibrinogen-Gens handelt es sich um eine funktionell wirksame Sequenzänderung in der Promotorregion an Position -455 mit einem Basenaustausch von Guanin (G) durch Adenin (A) (-455G/A-Polymorphismus).

Die Analysen erfolgen mit den nach Thomas et al. adaptierten BF-1- und BF-2-Primern (Thomas et al., 1991). Als Restriktionsendonuklease dient das Hae-III-Enzym, das bei Vorliegen des Polymorphismus die DNA nicht schneidet. Inkubiert wird im NEB 2-Puffer bei konstanten 37°C über mindestens 4 Stunden. Für die elektrophoretische Auftrennung verwendet man 2%ige Agarosegele, die Bandengrößen liegen zwischen 958 bp und 339 bp (siehe Abb. 13).

Der wildtype G/G-Genotyp wird aufgrund des kompletten Restriktionsverdaus als Positivkontrolle verwendet.

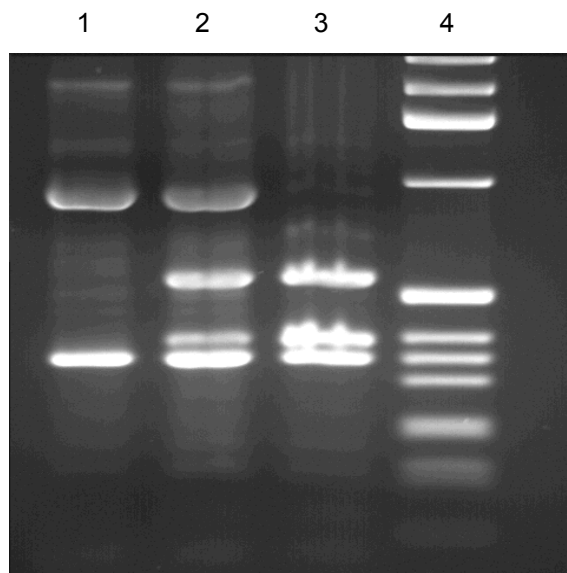


Abb.13 : Elektrophorese β -Fibrinogen

Spur 1: homozygoter Genotyp –455 A/A
 Spur 2: heterozygoter Genotyp –455 G/A
 Spur 3: wildtype Genotyp –455 G/G
 Spur 4: 1kb DNA ladder

2.5.7.3. Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1 (PAI-1)

Bei dem zu analysierenden Guanin-Insertions/Deletions-Polymorphismus des PAI-1-Gens handelt es sich um eine Abfolge von 4 oder 5 Guaninbasen (G) in der Promotorregion (Position –675) des PAI-1-Gens (4G/5G).

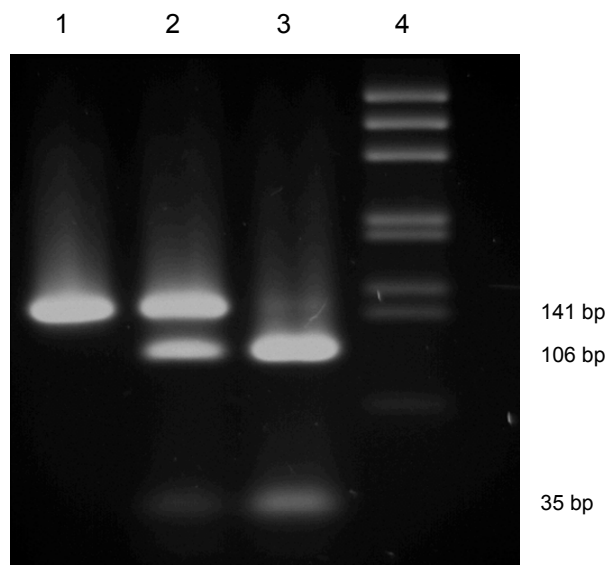


Abb.14 : Gelelektrophorese PAI-1

Spur 1: 4G/4G-Deletions-Genotyp
 Spur 2: heterozygoter Genotyp 4G/5G
 Spur 3: 5G/5G-Insertions-Genotyp
 Spur 4: 1kb DNA ladder

Der modifizierte Primer PAI 1-1 liefert in Kombination mit den 5G-Allelen die Schnittstelle für das Restriktionsenzym Bsl I (Margaglione et al. 1997). Die geeigneten Reaktionsbedingungen für das Restriktionsenzym schafft der zugehörige Puffer NEB 3. Der Verdau findet (meist über Nacht) im Thermocycler statt, welcher eine konstante Temperatur von 55°C gewährleistet. Da die Fragmente relativ klein sind (141, 106 und 35 bp), erfolgt die Auftrennung auf 2 %igen LMP-Agarosegelen (siehe Abb. 14).

Die 5G/5G-Fragmente werden komplett verdaut, weshalb man sie auch als Positivkontrolle einsetzt.

2.5.7.4. Angiotensin-Converting Enzym (ACE)

Analysiert wird ein im Intron 16 des für ACE kodierenden Gens gelegener Deletions/Insertions(D/I)-Polymorphismus. Ein Verdau durch Restriktionsendonukleasen erfolgt nicht. Folglich muss auch keine Positivkontrolle, die die Vollständigkeit des abgelaufenen Verdaus sicherstellen soll, mitgeführt werden.

Wegen der Größe der erwarteten Banden (490 und 190 bp) wird 1,5 %ige Agarose zur elektrophoretischen Auftrennung verwendet (siehe Abb. 15).

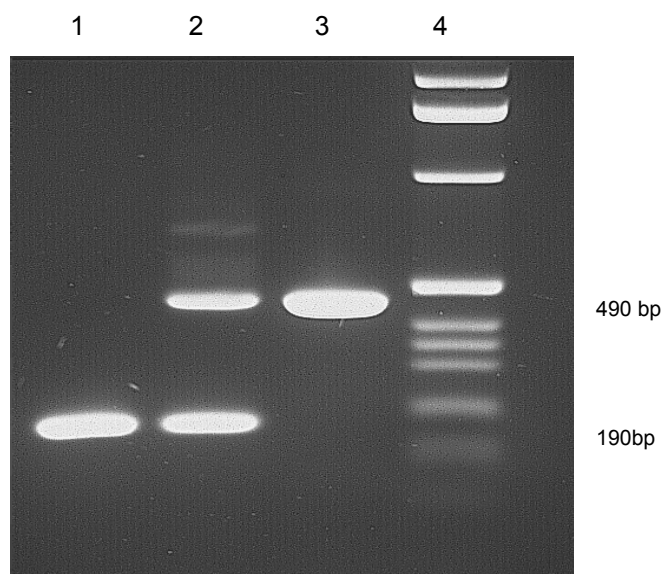


Abb.15: Gelelektrophorese ACE

Spur 1: homozygoter D/D-Genotyp

Spur 2: heterozygoter D/I-Genotyp

Spur 3: homozygoter I/I-Genotyp

Spur 4: 1 kb DNA ladder

Neben den eingesetzten Primern ACE-1 und ACE-2 muss zusätzlich zum Standard-PCR-Protokoll 2,5 µl DMSO zur Senkung der "Mistyping"-Quote eingesetzt werden. Trotzdem besteht immer noch die Gefahr, dass der heterozygote D/I-Genotyp falsch typisiert wird, da anstelle einer signifikanten Bande bei 490 bp eine nur schwache oder gar keine Bande im erwarteten Bereich zu finden ist. Zur Überprüfung auf eventuelles "Mistyping" ist es deshalb nötig, die als D/D klassifizierten Patienten einer weiteren PCR zu unterziehen, jedoch unter Verwendung eines weiteren Primerpaares (ACE-3/4) (Odawara et al. 1997). Diese "nested" Primer binden innerhalb der Sequenz der beiden ersten Primer (ACE-1/2). Dabei ist ein Primer insertionsspezifisch, so dass nur bei Vorhandensein des I-Allels eine Bande entsteht. Folglich wird der D/D-Genotyp bestätigt, wenn in der 2. PCR kein Produkt entsteht.

2.5.7.5. Übersicht

	Polymorphismus	Lage des Polymorphismus	Restriktionsenzym	Puffer	Inkubationstemp. Inkubationszeit
PAI-1	Guanin-Insertions/Deletions-Polymorphismus (4G/5G) (G→A)	Promotorregion des PAI-1-Gens	Bsl I	NEBuffer 3	55°C über Nacht im Thermocycler
GP IIIa	C/T-Polymorphismus (PIA ₁ /PIA ₂)	Exon 2 des GP IIIa- Gens	Msp I	Puffer L	37°C >4h
βF	-455G/A-Polymorphismus	Promotorregion des βF-Gens	Hae III	NEBuffer 2	37°C >4h
ACE	Deletions/Insertions-Polymorphismus (D/I)	Intron 16 des ACE-Gens			

Tab.17: Polymorphismen, Restriktionsenzyme, zugehörige Puffer und Inkubationsbedingungen

PAI-1: Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1, GP IIIa: Glykoprotein IIIa, ACE: Angiotensin-Converting Enzym,
βF: Beta-Fibrinogen

2.6. Statistik

Sämtliche Daten wurden prospektiv erhoben und in einer Access-Datenbank (Microsoft Inc., Redmond, USA) zusammengeführt.

Die Ergebnisse der RSA-Patientengruppe und der Kontrollgruppe wurden mit dem "Student-t-Test", dem "Chi-Quadrat-Test" nach Pearson und dem "Exakten Fisher-Test" statistisch ausgewertet. Das **relative Risiko** (RR) und dessen Konfidenzintervall von 95% wurden berechnet. Zur demographischen Datenerhebung wurde außerdem der "Mann Whitney-U-Test" herangezogen.

Die Durchführung erfolgte mit dem "Statistik-Paket für Social Sciences" (SPSS für Windows 9.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Für das Signifikanzniveau wurden 5% ($p\text{-Wert} \leq 0,05$) für signifikante Unterschiede und 1% ($p\text{-Wert} \leq 0,01$) für hoch signifikante Unterschiede gewählt.

.

3. Ergebnisse

3.1. Demographische Daten und Schwangerschaftsdaten

Die RSA-Patientengruppe war mit durchschnittlich 35 Jahren versus durchschnittlich 32 Jahren signifikant älter ($p=0,001$) als die Frauen der Kontrollgruppe (siehe Tab. 18).

In Übereinstimmung mit den Kriterien unserer beiden Vergleichskollektive fanden sich zudem statistisch signifikante Unterschiede betreffend die Anzahl der Schwangerschaften, der Aborte und der gesunden Kinder ($p=0,001$). Die RSA-Patientinnen hatten im Durchschnitt vier Schwangerschaften, die Kontrollgruppe dagegen nur eine Schwangerschaft. Fehlgeburten traten bei den RSA-Betroffenen durchschnittlich dreimal auf und definitionsgemäß einmal bei den Kontrollen. Im Durchschnitt konnten wir keine Geburt bei den RSA-Frauen versus eine Geburt bei den Kontrollen verzeichnen. In beiden Gruppen gab es allerdings Frauen, die vier Geburten erlebt hatten (siehe Tab. 18).

	RSA	Kontrollen	p-Wert
Anzahl	102	128	
Alter	35 (22-48)	32 (18-44)	0,001
Schwangerschaften	4 (2-9)	1 (1-4)	0,001
Aborte	3 (2-9)	0	0,001
Geburten	0 (0-4)	1 (1-4)	0,001

Tab. 18: Demographische Daten

	RSA	Kontrollen
Geburten gesamt	69	195
Keine Geburt	52,9% (54)	0,0%
Eine Geburt	34,3% (35)	57,0% (73)
Zwei Geburten	7,8% (8)	34,4% (44)
Drei Geburten	2,0% (2)	7,8% (10)
Vier Geburten	2,9% (3)	0,8% (1)

Tab. 19: Übersicht über die Anzahl der Geburten

Bei der Anzahl der Geburten wiesen die Kontrollen eine größere Gesamtzahl an Schwangerschaften auf, wobei im Durchschnitt eine Geburt vorlag. Bei den RSA-Frauen fand sich entsprechend meist keine Geburt (siehe Tab.19).

Primäre RSA (ohne vorangehende Geburt) lagen bei 63 Patientinnen (61,8%) vor, bei 39 Patientinnen (38,2%) handelte es sich um sekundäre RSA (mit vorangegangener Geburt eines gesunden Kindes). Dabei zeigten sich bei den sekundären RSA-Patientinnen im Vergleich zu den Patientinnen mit primären RSA signifikant mehr Schwangerschaften (Median = 5 (3-9) vs. Median = 4 (2-9); $p=0,001$) und mehr regelhafte Geburten (per definitionem) mit gesunden Kindern (Median = 1 (1-4) vs. Median = 0 (0-2); $p=0,001$).

3.2. Abortdaten

Abortanzahl und Aborte im 1. Trimenon

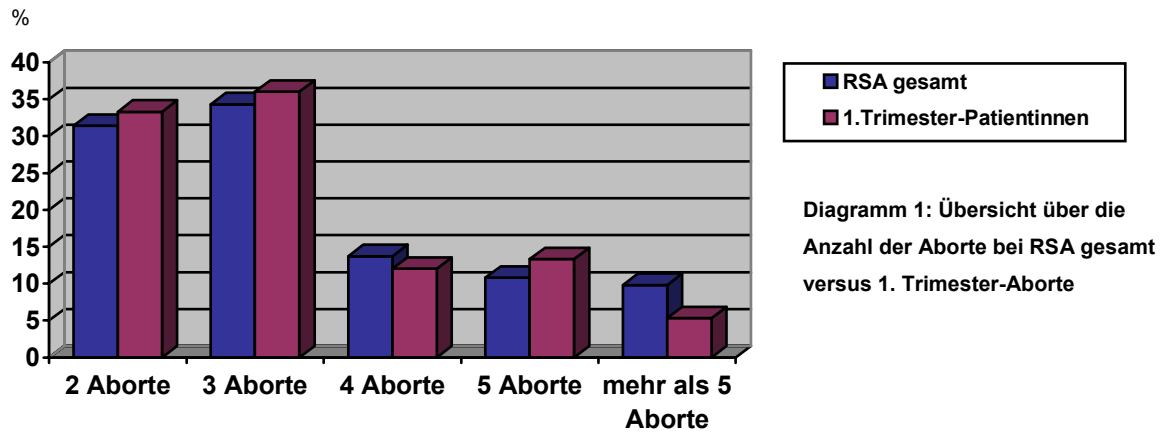
Insgesamt wurden bei den 102 RSA-Patientinnen 351 Aborte dokumentiert. Davon fallen 244 Aborte auf Patientinnen, deren wiederholte Fehlgeburten ausschließlich im ersten Trimenon (bis einschließlich 12. SSW) stattfanden (=1. Trimester-RSA-Patientinnen mit $n=75$) (siehe Tab.20).

	Anzahl n	Anzahl aller Aborte
RSA-Patientinnen gesamt	102	351
1.Trimester-RSA-Patientinnen	75	244

Tab. 20: Anzahl aller Aborte versus Aborte im 1. Trimenon

In Diagramm 1 wurde die Anzahl der einzelnen Aborte im gesamten RSA-Kollektiv der Abortanzahl der 1. Trimester-RSA-Patientinnen gegenübergestellt (siehe Diagramm 1). Bei den RSA-Patientinnen insgesamt traten bei 31,4% (32) zwei Aborte auf, versus 33,3% (25) bei den 1. Trimester-Patientinnen. Drei Aborte fanden sich ebenfalls prozentual häufiger bei den Patientinnen mit Beschränkung der Fehlgeburten auf das erste Trimenon als bei allen RSA-Patientinnen zusammen (36,0% (27) vs. 34,3% (35)). Bei nur 12,0% (9) der RSA-Patientinnen des ersten Trimesters ließen sich vier Aborte dokumentieren im Vergleich zu 13,7% (14) bei den RSA-Patientinnen insgesamt. Fünf Fehlgeburten zeigten sich vermehrt im ersten

Trimenon (13,3% (10) versus 10,8% (11) bei RSA gesamt). Mehr als fünf Aborte traten öfter bei allen RSA –Patientinnen zusammen auf (9,8% versus 5,3%).



Abortzeitpunkt

Zur Analyse des Abortzeitpunktes verzeichneten wir, wie viele Aborte in jeder Schwangerschaftswoche (SSW) aufgetreten sind.

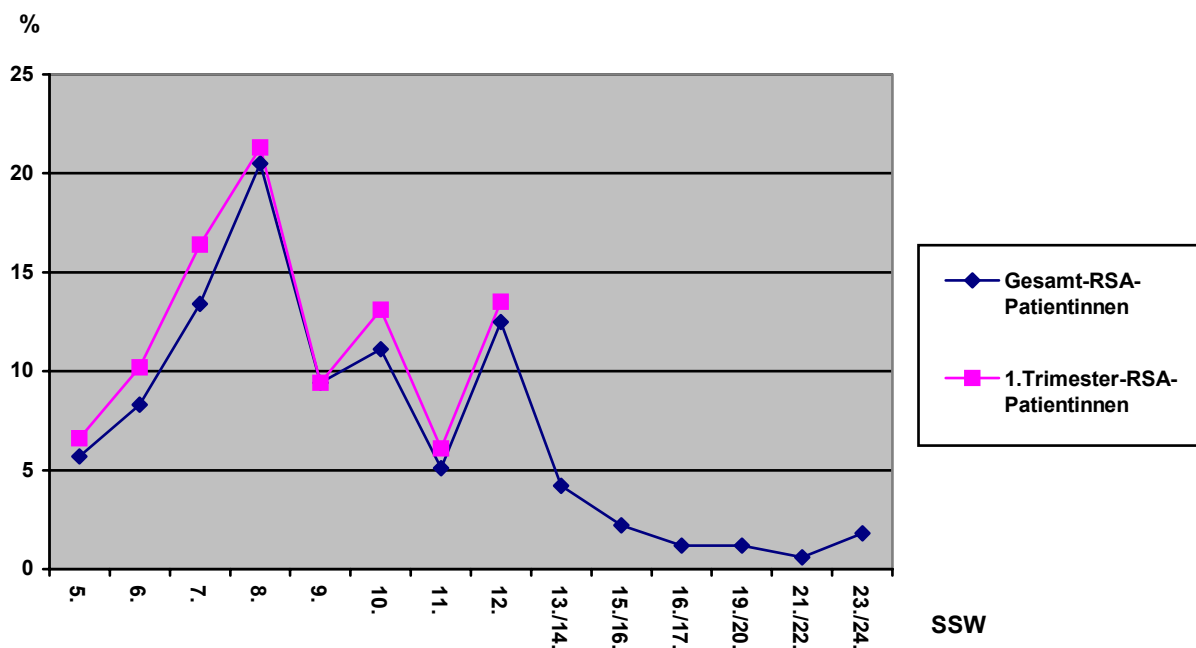


Diagramm 2: Übersicht über den Zeitpunkt der Aborte

blaue Linie: Die prozentualen Anteile aller Aborte (n=351) sind gegen die einzelnen Schwangerschaftswochen aufgetragen

rosa Linie: Beschränkung auf die Aborte des ersten Trimenons (n=244)

Die meisten Aborte der RSA-Patientinnen waren in der achten Schwangerschaftswoche eingetreten. Hier geschahen 20,5% (72) der insgesamt 351 Aborte (blaue Linie). Die zweit höchste Abortrate ließ sich in der 12.SSW erfassen (12,5% (44) der Aborte). Ein weiterer Gipfel war in der zehnten SSW zu erkennen (11,1% (39) der Aborte). Betrachtete man nur die 244 Aborte des ersten Trimenons (≤ 12 .SSW), so stellte sich ein nahezu paralleler Linienvverlauf dar (rosa Linie). Der Höchstpunkt befand sich ebenfalls in der 8.SSW mit 21,3% (52 Aborte).

3.3. Glykoprotein IIIa-Polymorphismus

Die Genotypenverteilung des Glykoprotein IIIa-Polymorphismus (GP IIIa) in dem RSA-Patientenkollektiv (n=102) wurde mit dem Kontrollkollektiv (n=128) verglichen. Der A₁/A₁-Genotyp (1565 C/C) fand sich bei 80 RSA-Patientinnen und bei 94 Kontrollen (78,4% vs. 74%, p=0,236). Der A₁/A₂-Genotyp (1565 C/T) konnte bei 21 Frauen mit krankhafter Fehlgeburtneigung versus 31 Vergleichspersonen nachgewiesen werden (20,6% vs. 24,4%, p=0,311), während sich die A₂/A₂-Homozygotie (1565 T/T) nur bei einer RSA-Patientin und zwei Kontrollen zeigte (1% vs. 1,6%, p=0,585) (siehe Tab. 21).

Die Frequenz des deutlich seltener auftretenden A₂-Allels betrug damit im RSA-Kollektiv 11,3% und im Vergleichskollektiv 13,8%. Ebenso wenig ergibt sich für die A₁-Allelfrequenz eine Signifikanz zwischen Patienten und Kontrollen (88,7% vs. 86,2%, n.s.).

	A ₁ /A ₁	A ₁ /A ₂	A ₂ /A ₂
RSA	80	21	1
Prozent %	78,4	20,6	1,0
Kontrollen	94	31	2
Prozent %	74,0	24,4	1,6
p-Wert	0,236	0,311	0,585

Tabelle 21: Ergebnisse Glykoprotein IIIa-Polymorphismus

3.4. Beta-Fibrinogen-Polymorphismus

Bei den statistischen Analysen des Beta-Fibrinogen-Polymorphismus ließen sich ebenfalls keine signifikanten Unterschiede in der Genotypenverteilung nachweisen.

Der homozygote –455 G/G-Genotyp wurde bei 59,8% Frauen der RSA-Gruppe versus 53,9% Kontrollen gefunden ($p=0,223$). Heterozygotie (G/A) konnte bei 32,4% der Patientinnen und bei 37,5% der Vergleichspersonen registriert werden ($p=0,251$). Deutlich seltener trat der homozygote A/A-Genotyp auf, nämlich bei 8 RSA-Frauen versus 11 gesunden Frauen (7,8% vs. 8,6%, $p=0,517$) (siehe Tab. 22).

Korrespondierend wichen die Häufigkeiten des G-Allels und des A-Allels bei Patienten und Kontrollen nur gering voneinander ab (G-Allel: 76,0% vs. 72,7%; A-Allel: 24,0% vs. 27,3%, n.s.). Anzumerken ist, dass das A-Allel deutlich seltener vorkam als das G-Allel.

	G/G	G/A	A/A
RSA	61	33	8
Prozent %	59,8	32,4	7,8
Kontrollen	69	48	11
Prozent %	53,9	37,5	8,6
p-Wert	0,223	0,251	0,517

Tabelle 22: Ergebnisse β -Fibrinogen-Polymorphismus

3.5. Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1-Polymorphismus

Zur Analyse des PAI-1-Polymorphismus wurden ebenfalls die RSA-Patientinnen ($n=102$) den Kontrollpatientinnen ($n=127$) gegenübergestellt (siehe Tab. 23).

Bei den RSA-Patientinnen wiesen 43 den 4G/4G-Genotyp auf, was 42,2% entspricht. Hingegen lag dieser Genotyp bei nur 41 Kontrollen vor (32,3%). Damit ist die Häufigkeit des 4G/4G-Genotyps bei RSA-Patientinnen mit $p=0,08$ tendenziell erhöht. Der 4G/5G-Genotyp war umgekehrt verteilt. Er fand sich bei 36 Patientinnen (35,3%) deutlich seltener als bei 58 Vergleichspersonen (45,7%). Der Unterschied war mit $p=0,073$ allerdings nicht signifikant. Wenn man die Untersuchung auf Fehlgeburten im ersten Trimenon beschränkte, verringerte sich der Unterschied (37,3% der Patientinnen). Bezüglich der 5G/5G-Homozygotie ergaben sich mit 23 RSA-Patientinnen versus 28 Kontrollen keine Signifikanzen (22,5% vs. 22,0%, $p=0,526$).

Die Ergebnisse korrelierten mit einer gering erhöhten 4G-Allelfrequenz bei der RSA-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe (59,8% vs. 55,1%). Die 5G-Allelfrequenz

hingegen trat mit 44,9% versus 40,2% etwas häufiger bei den Kontrollen als bei den Patienten auf.

	5G/5G	4G/5G	4G/4G
RSA	23	36	43
Prozent %	22,5	35,3	42,2
Kontrollen	28	58	41
Prozent %	22,0	45,7	32,3
p-Wert	0,526	0,073	0,08

Tabelle 23: Ergebnisse Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1-Polymorphismus

3.6. Angiotensin-Converting Enzym-Polymorphismus

Die ACE-Analyseergebnisse des Patientenkollektivs (n=101) wurden mit den ACE-Ergebnissen des Kontrollkollektivs (n=127) verglichen (siehe Tab. 24).

Der I/I-Genotyp ließ sich bei 22 Frauen mit krankhafter Fehlgeburtsneigung (21,8%) und bei 26 Vergleichspersonen (20,5%) nachweisen ($p=0,46$, n.s.). Der homozygote D/D-Genotyp trat dagegen bei RSA-Patientinnen tendenziell häufiger auf als bei den Gesunden (31,7% gegenüber 23,6%, $p=0,11$). Umgekehrte Verteilung zeigte die D/I-Heterozygotie. Diese kam seltener bei den unter wiederholten Abgängen Leidenden (46,5%) vor als bei dem Kontrollkollektiv (55,9%; $p=0,101$).

Die I-Allelfrequenz war bei den Kontrollen gegenüber den Patientinnen geringfügig erhöht und betrug 48,4% versus 45%. Die D-Allelfrequenz hingegen lag etwas häufiger bei den RSA-Patientinnen vor mit 55% versus 51,6% .

	I/I	D/I	D/D
RSA	22	47	32
Prozent %	21,8	46,5	31,7
Kontrollen	26	71	30
Prozent %	20,5	55,9	23,6
p-Wert	0,46	0,101	0,11

Tabelle 24: Ergebnisse Angiotensin-Converting Enzym-Polymorphismus

3.7. PAI-1-Polymorphismus in Kombination mit dem ACE-Polymorphismus

Da die Polymorphismen beider Gene trotz unterschiedlicher Angriffspunkte ihrer Proteinprodukte zu einer gemeinsamen Einflussgröße für die Fibrinolyse werden können, hat uns besonders die Kombination dieser beiden Faktoren interessiert. Verglichen wurden wiederum die Patientengruppe (n=101) und die Kontrollgruppe (n=127) (siehe Tab. 25).

Besonders fällt ein hoch signifikanter Unterschied mit $p=0,001$ für die in synergistischer Weise wirkende Kombination 4G/4G+D/D auf. 17,8% der Frauen mit wiederkehrenden Aborten wiesen diese Kombination auf versus 4,7% der Kontrollpersonen.

Des weiteren war der 4G/5G-Genotyp in Kombination mit dem D/I-Genotyp nach wie vor bei den Kontrollen mit 28,3% versus 18,8% erhöht. Der p-Wert betrug $p=0,064$.

Für weitere Kombinationen, wie etwa für 5G/5G+I/I, konnten wir keine relevanten Unterschiede zwischen dem Patientenkollektiv und der Vergleichsgruppe (6,9% vs. 4,7%; n.s.) finden.

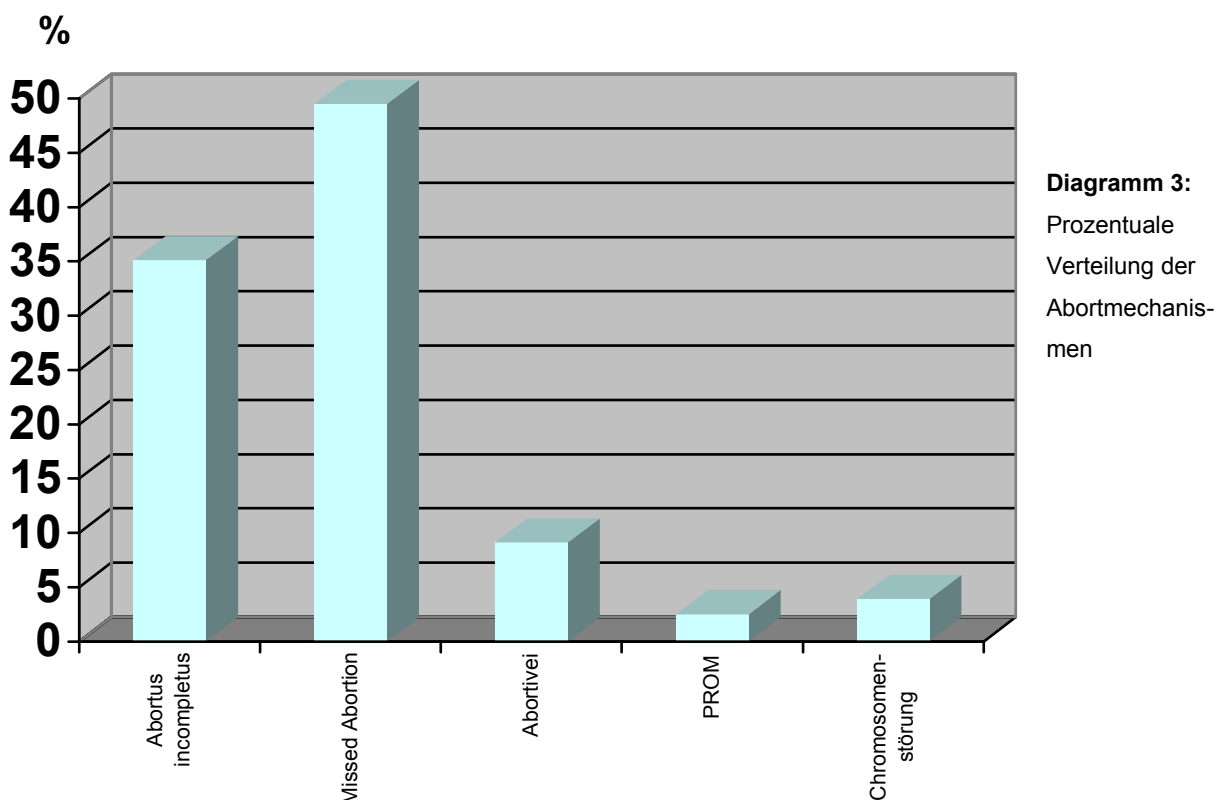
	%	5G/5G	4G/5G	4G/4G
I/I	Patienten	6,9	8,9	5,9
	Kontrollen	4,7	6,3	9,4
	p-Wert	0,333	0,310	0,235
D/I	Patienten	9,9	18,8	17,8
	Kontrollen	9,4	28,3	18,1
	p-Wert	0,541	0,064	0,548
D/D	Patienten	5,9	7,9	17,8
	Kontrollen	7,9	11,0	4,7
	p-Wert	0,383	0,289	0,001

Tabelle 25: Ergebnisse ACE-Polymorphismus in Kombination mit dem PAI-1-Polymorphismus

3.8. Abortmechanismen

In der RSA-Patientengruppe (n=102) traten insgesamt 351 Fehlgeburten auf. Der für jeden Abort verantwortliche Mechanismus wurde registriert und nach pathogenetischen Gesichtspunkten in Gruppen eingeteilt (siehe Kap. 1.3.6., 2.2.).

Für 66 (18,8%) Fehlgeburten ließ sich aufgrund von nicht eruierbaren Angaben keine Einteilung vornehmen. Die verbleibenden restlichen 285 Fehlgeburten verteilten sich wie folgt: Blutungskomplikationen bzw. Abortus incompletus traten bei 100 (35,1%) Fehlgeburten auf. Missed abortion bzw. intrauteriner Fruchttod (IUFT) wurden bei 141 (49,5%) Fällen festgestellt. Abortiveier fanden sich bei insgesamt 26 (9,1%) Schwangerschaftsverlusten. Vorzeitiger Blasensprung bzw. premature rupture of the membranes (PROM) wurde in 7 (2,5%) Fällen dokumentiert. Bei 11 (3,9%) der



registrierten Aborte fand sich eine embryonale Chromosomenstörung als Ursache (siehe Diagramm 3).

Anzumerken ist, dass die Spontanaborte der 102 RSA-Patientinnen vornehmlich intraindividuell zufällig verteilt waren. Bei 49 (56%) Patientinnen wurden unterschiedliche Abortmechanismen registriert, 38 (43,7%) Frauen präsentierten

einen konstanten Mechanismus ihrer Schwangerschaftsverluste. 15 (14,7%) Patientinnen konnten aufgrund unzureichender Angaben nicht sicher beurteilt werden und wurden ausgeschlossen.

Aufgrund von fehlender DNA bei einer Patientin mit vier Fehlgeburten wurde der ACE-Polymorphismus nur bei 101 RSA-Patientinnen bestimmt. Bei der Auswertung des ACE-Polymorphismus wurde deshalb nicht von einer Gesamtzahl von 285 Fehlgeburten ausgegangen, sondern von 281 Fehlgeburten.

Im Zusammenhang mit einer hypo- bzw. hyperfibrinolytischen Wirkung war für uns die Korrelation zwischen dem PAI-1-Polymorphismus und dem ACE-Polymorphismus, bedeutende hämostaseologische Einflussfaktoren, und den Abortmechanismen Blutungskomplikation/Abortus incompletus (verstärkte Blutung), missed abortion/IUFT (Verdacht auf Mikrozirkulationsstörung) und Abortivei (Verdacht auf Anlagestörung) von besonderem Interesse.

3.8.1. Abortmechanismus Blutungskomplikation / Abortus incompletus

Der Abortmechanismus Blutungsstörung konnte bei 100 (35,1%) Fällen der insgesamt 285 eingeteilten Fehlgeburten verzeichnet werden. Bezüglich des ACE-Polymorphismus standen 98 (34,9%) Fehlgeburten mit der Diagnose Blutungskomplikation zur Auswertung zur Verfügung, ausgehend von 281 Fehlgeburten.

Bei der Analyse des **PAI-1-Polymorphismus** fand sich der 5G/5G-Genotyp bei 33 (33,0%) der 100 Schwangerschaftsverluste mit ursächlichen Blutungskomplikationen bzw. Abortus incompletus, versus 36 (19,5%) der 185 Abgänge aufgrund anderer Mechanismen. Hierfür ergab sich mit $p=0,01$ ein signifikanter Zusammenhang.

Für den 4G/5G-Genotyp ließ sich kein relevanter Unterschied zwischen dem Abortmechanismus verstärkte Blutungen und den anderen ursächlichen Mechanismen nachweisen (31,0% vs. 35,7%, $p=0,43$).

Ebenso zeigte der 4G/4G-Genotyp keine Korrelation zu den Fehlgeburten mit Blutungskomplikationen bzw. Abortus incompletus (36,0% vs. 44,9%, $p=0,15$).

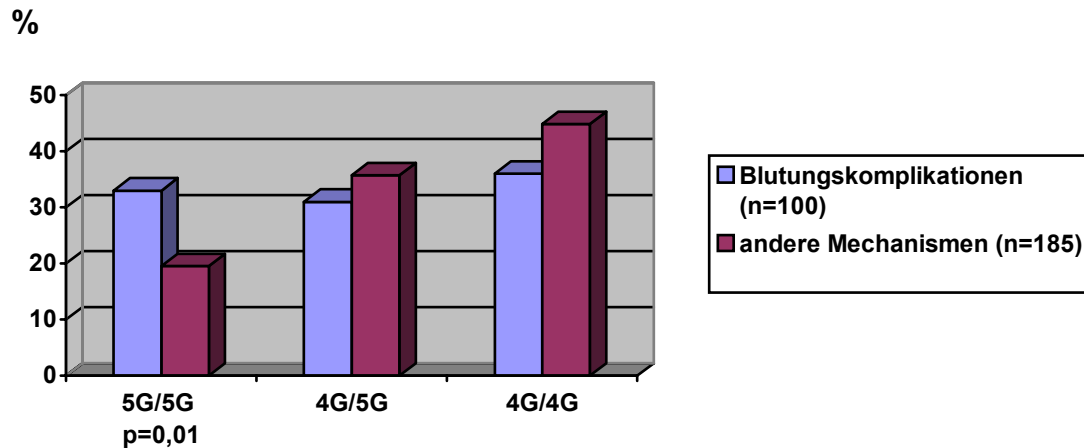


Diagramm 4: PAI-1-Genotypen in Relation zum Abortmechanismus Blutungskomplikationen

Die Auswertung des **ACE-Polymorphismus** ergab bei 29 (29,6%) von 98 Aborten mit Blutungskomplikationen den I/I-Genotyp, versus 29 (15,8%) von 183 Aborten ohne Blutungskomplikationen. Entsprechend errechnete sich mit $p<0,01$ ein hoch signifikanter Zusammenhang.

Der D/I-Genotyp fand sich hingegen bei diesem Abortmechanismus mit 34 (34,7%) von 98 Fällen mit Blutungskomplikationen hoch signifikant seltener als bei 104 (56,8%) von 183 Fehlgeburten, bei denen der Mechanismus Blutungen/Abortus incompletus nicht verantwortlich zu machen war ($p<0,01$).

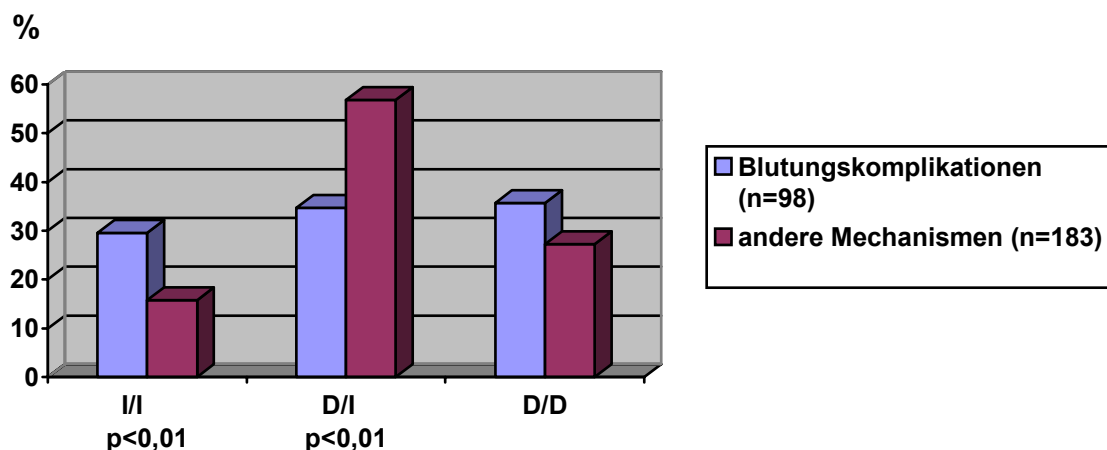


Diagramm 5: ACE-Genotypen in Relation zum Abortmechanismus Blutungskomplikationen

Der D/D-Genotyp zeigte keine Relation zu den Aborten mit verstärkten Blutungen (35,7% vs. 27,3%, $p=0,14$).

3.8.2. Abortmechanismus Missed Abortion / Intrauteriner Fruchttod

Die Diagnose missed abortion bzw. intrauteriner Fruchttod wurde bei 141 (49,5%) der insgesamt 285 eingeteilten Fehlgeburten gestellt. Zur Auswertung des ACE-Polymorphismus standen 140 Fälle mit diesem Abortmechanismus zu Verfügung.

Die Analyse des **PAI-1-Polymorphismus** erbrachte mit 27 (19,1%) von 141 Schwangerschaftsverlusten mit ursächlichem missed abortion oder intrauterinem Fruchttod ein deutlich schwächeres Auftreten des 5G/5G-Genotyps gegenüber 42 (29,2%) von 144 Aborten mit anderen Mechanismen ($p=0,05$).

Bezüglich des 4G/5G-Genotyps ließ sich kein relevanter Unterschied zwischen Fehlgeburten nach missed abortion/IUFT und Fehlgeburten mit anderen verantwortlichen Mechanismen erkennen (37,6% vs. 30,6%, $p=0,21$).

Auch bei dem 4G/4G-Genotyp konnte keine Relation zu den Abgängen mit missed abortion bzw. intrauterinem Fruchttod festgestellt werden (43,3% vs. 40,3%, $p=0,61$).

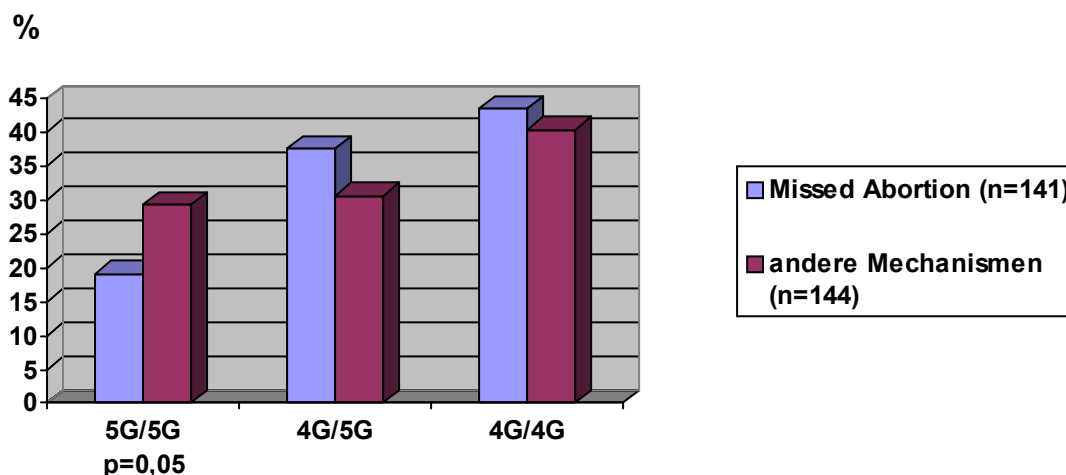


Diagramm 6: PAI-1-Genotypen in Relation zum Abortmechanismus Missed Abortion/IUFT

Hinsichtlich des **ACE-Polymorphismus** wurde der I/I-Genotyp mit 17 (12,1%) von 140 Schwangerschaftsverlusten durch missed abortion oder intrauterinen Fruchttod

hoch signifikant seltener nachgewiesen als bei 41 (29,1%) von 141 Aborten anderer Ursache ($p < 0,01$).

Bei Abgängen mit ursächlichem missed abortion bzw. IUFT trat der D/I-Genotyp dagegen mit 86 (61,4%) von 140 Fällen statistisch hoch signifikant häufiger auf als bei 52 (36,9%) von 141 Schwangerschaftsverlusten, bei denen dieser Abortmechanismus nicht vorlag ($p < 0,01$).

In Bezug auf den D/D-Genotyp ergaben sich wiederum keine bedeutenden Unterschiede (26,4% vs. 34,0%, $p = 0,16$).

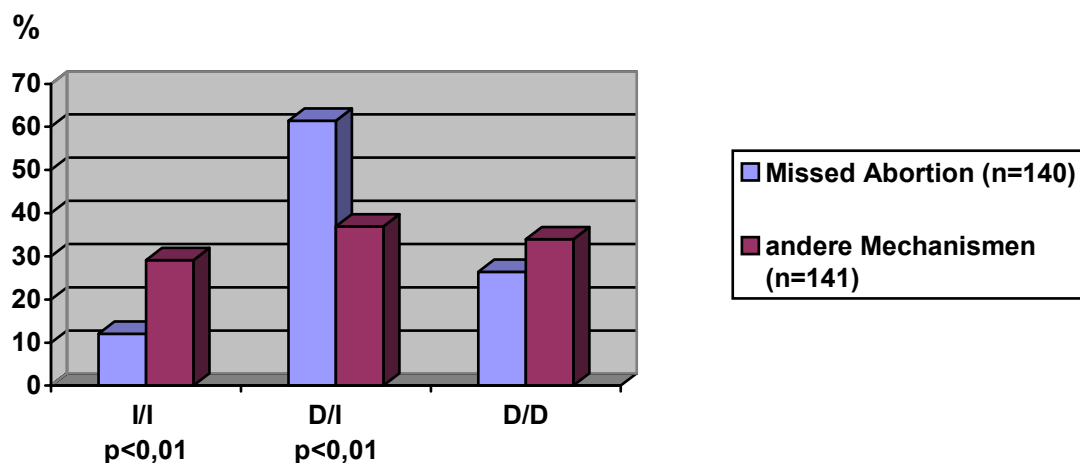


Diagramm 7: ACE-Genotypen in Relation zum Abortmechanismus Missed Abortion/IUFT

3.8.3. Abortmechanismus Abortivei

Nur bei 26 (9,1%) Fehlgeburten der gesamten 285 Fehlgeburten konnte die Diagnose Abortivei sicher gestellt werden.

Die Auswertung des **PAI-1-Polymorphismus** zeigte keinen Zusammenhang eines PAI-1-4G/5G-Genotypen mit dem Abortmechanismus Abortivei.

Bei 5 (19,2%) der 26 Aborte, die mit fehlender Embryonalanlage einher gingen, lag der 5G/5G-Genotyp vor, versus 64 (24,7%) der 259 Aborte mit anderen ursächlichen Mechanismen ($p = 0,53$).

Für den 4G/5G-Genotyp (26,9% vs. 34,7%; $p = 0,42$), sowie für den 4G/4G-Genotyp (53,8% vs. 40,5%; $p = 0,19$) konnten ebenfalls keine relevanten Unterschiede

zwischen den Fehlgeburten mit Abortivei und den Fehlgeburten anderer Ursache abgeleitet werden.

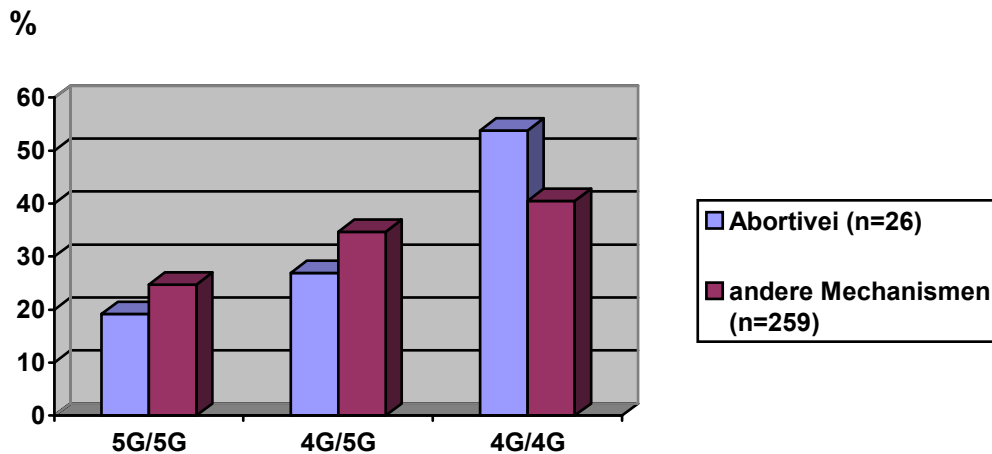


Diagramm 8: PAI-1-Genotypen in Relation zum Abortmechanismus Abortivei

Die Auswertungen des **ACE-Polymorphismus** waren bei 25 Schwangerschaftsverlusten mit Abortivei als Ursache möglich. Für die restlichen 256 Fehlgeburten waren andere Abortmechanismen verantwortlich zu machen.

Bei 10 (40,0%) der 25 Schwangerschaften, die als Abortivei endeten, lag der I/I-Genotyp vor, versus 48 (18,8%) der 256 Schwangerschaften mit anderen zum Abort führenden Mechanismen. Dafür errechnete sich eine statistische Signifikanz mit $p=0,01$.

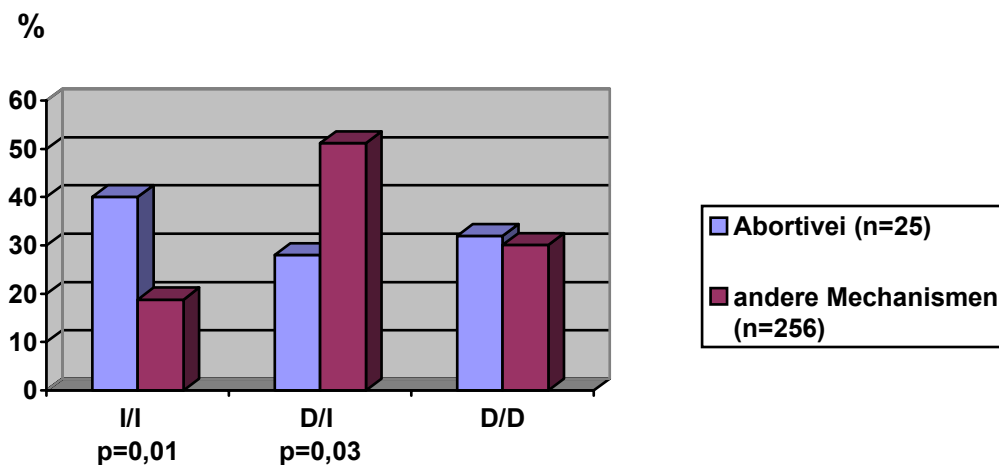


Diagramm 9: ACE-Genotypen in Relation zum Abortmechanismus Abortivei

Im Gegensatz dazu konnte der D/I-Genotyp bei nur 7 (28,0%) der 25 Schwangerschaftsverluste mit registriertem Abortivei nachgewiesen werden, versus 131 (51,2%) der 256 Aborte mit anderen verantwortlichen Ursachen als eine fehlende Embryonalanlage. Diesbezüglich war der Zusammenhang mit $p=0,03$ signifikant.

Für den D/D-Genotyp ließ sich ein nur unerheblicher Unterschied zwischen dem Mechanismus Abortivei und den anderen dokumentierten Mechanismen feststellen (32,0% vs. 30,1%; $p=0,84$).

3.8.4. Abortmechanismus Vorzeitiger Blasensprung / PROM

In der Gruppe vorzeitiger Blasensprung/premature rupture of the membranes (PROM) wurden in unserem Kollektiv, welches sich überwiegend aus Fehlgeburten des 1. Trimenons rekrutierte, nur 7 Fälle verzeichnet, was einem Anteil von 2,5% entspricht. Diese Fallzahl ist für eine valide statistische Auswertung zu gering, weshalb darauf verzichtet wurde.

3.8.5. Abortmechanismus Chromosomenstörung / Genabnormalität

Im Rahmen der genetisch determinierten Abortursachen ist zu differenzieren, ob die genetische Abweichung in den elterlichen Chromosomensätzen verankert ist oder ob eine embryonale Chromosomenstörung vorliegt. In dieser Gruppe wurden bei 11 (3,9%) Fehlgeburten Chromosomenveränderungen im Schwangerschaftsprodukt registriert. Ein Zusammenhang zum mütterlichen Genotyp der beiden Polymorphismen kann nicht hergestellt werden.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden thrombophile Genmutationen bei Patientinnen mit rezidivierenden Spontanaborten ohne "fassbare" Ursache untersucht. Dazu wurden bereits bekannte Polymorphismen in dem für den Plasminogen-Aktivator-Inhibitor 1 (PAI-1), das Angiotensin-Converting Enzym (ACE), das Glykoprotein IIIa (GP IIIa) und das Beta-Fibrinogen kodierenden Gen analysiert. Die Polymorphismen wurden bei RSA-Patientinnen und Kontroll-Patientinnen mittels molekulargenetischer Methoden analysiert und die Häufigkeiten miteinander verglichen.

Die Überlegungen, die zur Entstehung dieser Arbeit führten, sind kurz angedeutet. Polymorphismen und Genmutationen in Gerinnungsfaktoren sowie in Faktoren der Fibrinolysekaskade stehen seit geraumer Zeit im Fokus des Interesses bei der Aufklärung einer angeborenen Neigung zu thrombotischen Komplikationen und Gerinnungsstörungen. Eine Übersicht bereits bekannter Zusammenhänge zwischen Polymorphismen in Genen der Gerinnungskaskade und venös-arteriellen thrombembolischen Defekten und deren unterschiedlichen Auswirkungen wurde kürzlich veröffentlicht (Lane et Grant, 2000). Zudem werden häufig schwangerschaftsassozierte Probleme wie Präeklampsie, abruptio placentae, fetale Retardierung und Totgeburten in Verbindung mit intervillösen und spiralarteriellen Thrombosen sowie inadäquater plazentarer Perfusion beschrieben (Kupfermine et al., 2000). Bei Frauen mit derartigen Komplikationen lassen sich Mutationen finden, die zu Thrombosen prädisponieren (Kupfermine et al., 1999, Blumenfeld et Brenner 1999, Pihusch et al., 2001). Mit der Möglichkeit der molekulargenetischen Untersuchung auf weitere thrombophile Genmutationen bei idiopathischen rezidivierenden Spontanaborten ist das diagnostische Spektrum dieser bisher noch teilweise frustrierenden Gesamtabklärung erweitert worden.

Der mehrmalige Nachweis von Mikrothrombosen und Fibrindepositionen im Abortmaterial erweckte den Verdacht, dass hämostaseologische Prozesse möglicherweise aufgrund der resultierenden fetalen Minderperfusion und Hypoxie für die Entstehung der wiederholten Fehlgeburten mitverantwortlich zu machen sind (Yamada et al., 2000, Newton et Rutherford 2001).

Sowohl eine erfolgreiche Implantation als auch eine funktionierende uteroplazentare Zirkulation benötigen eine exakte Regulation und Kontrolle des Gleichgewichtes zwischen Hämostase und Fibrinolyse (Sarto et al., 2000).

Einerseits übernimmt Fibrin eine Schlüsselfunktion bei der Stabilisierung des Plazentagerüstes und der Verankerung der Basalplatte. Andererseits aber muss ein optimaler Blutfluss durch die intervillösen Räume und plazentare Strombahn sichergestellt werden.

Die analysierten Faktoren spielen in diesem Zusammenhang eine bedeutende Rolle. Eine wichtige Kontrollfunktion der Fibrinolyse übernimmt dabei der Plasminogen-Aktivator-Inhibitor-1 im Sinne einer Hemmung. Das Angiotensin-Converting Enzym fungiert diesbezüglich als Modulator und Regulator der PAI-1-Konzentration (Matsubara et al., 2000) (siehe Kap. 1.3.5. und Abb. 8).

Der Membranrezeptor GPIIIa und das β -Fibrinogen sind dagegen bei der Thrombozytenaggregation beteiligt und deshalb wichtige Faktoren bei der Thromboseentstehung (siehe Kap. 1.3.1 und Abb. 5).

Um einen möglichen Zusammenhang der Faktoren mit rezidivierenden Spontanaborten (RSA) unklarer Genese herauszufinden, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob es eine Häufung der analysierten Polymorphismen bei den RSA-Patientinnen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe von Frauen mit unkomplizierten Schwangerschaften gibt.

4.1. Glykoprotein IIIa-Polymorphismus

Als Membranrezeptorkomplex für Fibrinogen spielt Glykoprotein IIb/IIIa eine wichtige Rolle bei der Thrombozytenaggregation und -adhäsion (siehe Kap. 1.3.1). Ein Zusammenhang des PIA₂-Allels mit erhöhter Thromboseneigung auf dem Boden einer kardiovaskulären Erkrankung konnte bereits gezeigt werden (Weiss et al., 1996, Garcia et al., 1998).

Bei unseren Analysen des GPIIIa-PIA₁/PIA₂-Polymorphismus ließen sich dagegen keine aussagekräftigen Unterschiede oder Tendenzen eines Genotyps nachweisen. Es zeigten sich homogene Verteilungen in beiden Kollektiven. Der beschriebene

thrombosesteigernde Effekt des PIA₂-Allels (Weiss et al., 1996, Garcia et al., 1998) konnte also in unserem RSA-Kollektiv nicht bestätigt werden. Erwähnt sei aber, dass unsere ermittelte A₂ –Allelfrequenz ziemlich genau mit der in Publikationen angegebenen A₂ –Allelfrequenz (Hermann et al., 1997) übereinstimmt (siehe Kap. 1.3.1 und 3.3.).

Auf der Basis unserer Ergebnisse könnte man den Schluss ziehen, dass der PIA₁/PIA₂-Polymorphismus wahrscheinlich keine ausschlaggebende Wirkung auf die ursächlichen, hämostaseologisch-thrombozytenaggregatorischen Phänomene der wiederkehrenden Spontanaborte ausübt. Die Implantation, die fetoplazentare Zirkulation und das Überleben des Embryos scheinen zumindest von diesem Polymorphismus nicht beeinträchtigt zu werden.

Die Ergebnisse der Glykoprotein IIIa-Untersuchungen müssen jedoch vor dem Hintergrund der niedrigen Fallzahlen des A₂A₂-Genotyps unter kritischen Gesichtspunkten gesehen werden. Es gestaltet sich schwierig, valide Ergebnisse zu erhalten und eine mögliche Wirkung dieses Genotyps nachweisen zu können. Aus diesen Gründen zeigten sich vermutlich auch bei anderen Arbeitsgruppen Kontroversen (Lane et al., 2000).

Zum einen gelang es Weiss et al. (1996) bei einem Patientenkollektiv von n=71 und einem Kontrollkollektiv von n=68 eine Assoziation des A₂-Allels mit einem erhöhten Risiko für koronare Thrombosierung nachzuweisen. Am deutlichsten war die Assoziation bei Patienten, die erstmalig einen Myokardinfarkt erlitten hatten und unter 60 Jahre alt waren. Garcia et al. (1998) stellten als Resultat ihrer Untersuchungen die These auf, dass der Glykoprotein IIIa-Polymorphismus einen Risikofaktor für kardiovaskuläre Krankheiten bis hin zu koronaren Verschlüssen darstellt. Bei einem Patientenkollektiv von n=100 und einem Vergleichskollektiv von n=100 zeigten sie einen Zusammenhang des A₂-Allels mit koronarer Stenosierung, insbesondere bei den Patienten unter 60 Jahren.

Andererseits aber gibt es auch Untersuchungen, die diese Ergebnisse widerlegen. Angeführt sei eine große multizentrische Studie im Rahmen koronarer Herzerkrankungen mit 620 Patienten und 700 Kontrollen (Herrmann et al., 1997). Eingeschlossen wurden Myokardinfarkt-Patienten, die die WHO Kriterien für einen definitiven akuten Myokardinfarkt erfüllten und Kontrollen ohne Nachweis einer

kardiovaskulären Problematik. Patienten und Kontrollen stammten von Nord Irland und Frankreich und waren zwischen 25 und 64 Jahre alt. Die Ergebnisse zeigten keine unterschiedliche Genotypenverteilung zwischen Patienten und Kontrollen. Ebenso wenig fand die Arbeitsgruppe von Samani et al. (1997) mit 242 Patienten, die erstmalig einen Herzinfarkt erlitten hatten und 209 Kontrollen einen Zusammenhang des A₂-Allels mit Myokardinfarkten.

4.2. Beta-Fibrinogen-Polymorphismus

In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass das A-Allel des G/A-Polymorphismus des β -Gens mit einem erhöhten Thromboserisiko vergesellschaftet sein kann. Ursächlich dafür könnte der gesteigerte Fibrinogenspiegel bei Vorliegen des A-Allels sein (Lane et Grant 2000, Humphries et al., 1997, de Maat et al., 1998, Behague et al., 1996). Ein Überangebot an Fibrinogen verursacht möglicherweise eine unverhältnismäßige Thrombozytenaggregation und damit eine übermäßige Thrombenbildung.

Unsere Ergebnisse zum G/A-Polymorphismus zeigten jedoch keinen Schwerpunkt in der Genotypenverteilung zwischen RSA-Patientenkollektiv und Kontrollkollektiv. Dabei lag unsere ermittelte A-Allelfrequenz bei den Kontrollen und den Patienten etwas höher als in der Veröffentlichung von Humphries et al. (1997) beschrieben (nach Humphries 20%; bei unseren Kontrollen 27,3% und bei den Patienten 24,0%).

Wichtig ist, dass das A-Allel deutlich seltener auftritt als das G-Allel, was bereits bei mehreren Untersuchungen mit unterschiedlichen Teilnehmerzahlen zu abweichenden Ergebnissen geführt hat. Dazu ist die Studie über koronare Verschlusskrankheiten von van-der-Boom et al. (1998) zu erwähnen, bei der die untersuchten Kollektive mit 139 Patienten im Alter von über 55 Jahren mit nachweislichem Myokardinfarkt und 287 asymptomatischen Kontrollen den unseren Kollektiven zahlenmäßig ungefähr gleich kamen. Gardemann et al. (1997) leiteten eine umfangreichere Studie unter gleichen Bedingungen mit 923 Patienten, die angiographisch gesicherte ischämische Herzerkrankungen oder Myokardinfarkte aufwiesen. In beiden Studien wurden nach abnormen Fibrinogenwerten gefahndet

und das damit verbundene thrombembolische Erkrankungsrisiko bestimmt. Es konnte zwar eine Erhöhung des Fibrinogenspiegels bei Vorliegen des A-Allels bestätigt werden, nicht aber der Zusammenhang mit Myokardinfarkten und damit mit einem gesteigerten Thrombembolierisiko. Die Fibrinogenerhöhung könnte vielleicht sekundär durch einen bedeutenderen Faktor bedingt gewesen sein, oder der Einfluß auf die Genese der untersuchten Erkrankung war möglicherweise zu gering. Diese Überlegungen könnten auch auf unsere RSA-Ergebnisse zutreffend sein. In der multizentrischen Studie von de Maat et al. (1998) gelang es auch einen Zusammenhang mit Myokardinfarkten nachzuweisen. Die Studie schloss 885 männliche Patienten mit symptomatischer und angiographisch gesicherter koronarer Herzkrankheit ein. Die Patienten waren unter 70 Jahre alt und hatten normale oder nur leicht erhöhte Serumcholesterinspiegel. Bei den Trägern des A-Allels konnten erhöhte Fibrinogenspiegel und auch ein erhöhtes Risiko für koronare Herzkrankheit und Myokardinfarkte nachgewiesen werden. Bei Wang et al. (1997) zeigte sich weder ein Zusammenhang eines G/A-Genotyps mit dem Fibrinogenplasmaspiegel noch mit einem gehäuften Auftreten koronarer Herzerkrankungen. Das Patientenkollektiv setzte sich aus 545 männlichen und weiblichen, australischen Patienten unter 65 Jahren zusammen. Es musste eine KHK über mindestens 16 Monate Dauer diagnostiziert worden sein. Als Ursache dafür, dass hier keine Assoziation gefunden wurde, könnten möglicherweise die gleichen Punkte eine Rolle spielen wie in unserer RSA-Untersuchung. Zum einen muss natürlich die seltene Allelfrequenz des G/A-Polymorphismus in Betracht gezogen werden. Zum anderen sind sicherlich weitere, nicht berücksichtigte Faktoren, insbesondere Umweltfaktoren beteiligt (Margaglione et al., 1998b), die unter Umständen den Effekt des Polymorphismus maskiert haben könnten.

Insgesamt können wir in unserem Kollektiv über keinen Effekt des G/A-Polymorphismus auf wiederholte Schwangerschaftsverluste berichten. Die beschriebene Erhöhung der Fibrinogenkonzentration bei vorliegendem A-Allel ist wahrscheinlich nicht ausreichend, um thrombotische Perfusionsprobleme auszulösen, die einen Abort zur Folge haben.

4.3. Plasminogen-Aktivator-Inhibitor Typ 1-Polymorphismus

Aufgrund mehrerer Studien ist mittlerweile allgemein anerkannt, dass das 4G-Allel des PAI-1-Gens zu einer verstärkten PAI-1-Expression führt, was mit einer verminderten Plasminaktivität und Fibrinolyseaktivität und einem folglich gesteigertem Thromboserisiko einhergeht (Lane et Grant, 2000; siehe Kap. 1.3.3.2). Das 4G-Allel des PAI-1-Gens wurde daher häufig als ein thrombembolischer Risikofaktor bezeichnet (Margaglione et al., 1998a, Gardemann et al., 1999, Iacoviello et al., 1998). Entsprechend könnte das 4G-Allel bei der Entstehung der Fibrindepositionen in abortierten Plazenten beteiligt und damit für eine erhöhte Neigung zu wiederholten Fehlgeburten mitverantwortlich sein.

Übereinstimmend mit den theoretischen Überlegungen trat der 4G/4G-Genotyp in unserer Studie tatsächlich häufiger bei den Frauen mit der RSA-Problematik auf als im Vergleichskollektiv. Korrespondierend zeigte sich eine, wenn auch nur gering erhöhte 4G-Allelfrequenz im RSA-Kollektiv. Der 4G/4G-Genotyp führt also höchstwahrscheinlich auch bei den RSA-Betroffenen via einer verstärkten PAI-1-Aktivität zu einer verminderten Plasmin- und Fibrinolyseaktivität (siehe Kap. 1.3.3.2). Es entsteht eine erhöhte Thromboseneigung, was die Gefahr der plazentaren Minderperfusion und der Störung der uteroplazentaren Einheit mit sich bringt. Demzufolge könnte der PAI-1-4G/4G-Genotyp eine wichtige Rolle bei der thrombotisch bedingten Genese rezidivierender Spontanaborte beziehungsweise der RSA-Neigung spielen und sollte deshalb als ätiologisch bedeutender, thrombembolischer Risikofaktor betrachtet werden.

Der PAI-4G/5G-Genotyp fand sich bedeutend öfter bei dem gesunden Vergleichskollektiv. Eine mögliche Erklärung dafür wäre, dass das 5G-Allel –als Gegenspieler zum 4G-Allel– zu einem verminderten PAI-1-Spiegel und einer daraus resultierenden vermehrten Plasminaktivität führen könnte (siehe Kap. 1.3.3.2). Plasmin bedingt eine Zersetzung extrazellulärer Matrix; es kommt zur Hyperfibrinolyse. Die gegensätzlichen Effekte des thrombosefördernden 4G-Allels einerseits und des zur Hyperfibrinolyse führenden 5G-Allels andererseits könnten sich hier gegenseitig ausgeglichen haben. Dementsprechend könnte man spekulieren, dass der 4G/5G-Genotyp keine ausschlaggebende Wirkung auf die

hämostaseologischen Phänomene der krankhaften Fehlgeburtstendenz hat und deshalb bei den unbetroffenen Frauen gehäuft auftrat. Zu ähnlicher Ansicht kam die Arbeitsgruppe von Margaglione et al. (1998c). Das Studienkollektiv bestand aus 446 Männern und 586 Frauen zwischen 22 und 66 Jahren ohne Hinweise auf atherosklerotische Gefäßveränderungen. Sie untersuchten die Abhängigkeit der PAI-1-Plasmakonzentration von Umweltfaktoren, dem PAI-1-4G/5G- und dem ACE-D/I-Genotyp. Margaglione et al. (1998c) konnten bei Männern, Rauchern und Alkoholikern erhöhte PAI-1-Aktivität nachweisen. Weiterhin zeigten sie aber, dass der PAI-1-4G/5G- sowie der ACE-D/I-Genotyp keine relevanten Veränderungen des PAI-Plasmaspiegels bedingen.

Der 5G/5G-Genotyp zeigte dagegen eine nahezu gleichmäßige Verteilung auf das RSA-Kollektiv und die Kontrollen. Jedoch fiel auf, dass bei diesem Genotyp die Aborte vermehrt im ersten Schwangerschaftsdrittel auftraten. Die Überlegung, dass eine Hyperfibrinolyse Ursache früher rezidivierender Spontanaborte sein könnte, wird durch Untersuchungen von Sarto et al. (2000) gestützt. Die Arbeitsgruppe führte eine prospektive Studie mit 114 Patientinnen durch. Eingeschlossen wurden Frauen mit zwei oder mehr unerklärlichen Fehlgeburten vor der 12. SSW (Gruppe 1) sowie Frauen mit mindestens zwei missglückten Implantationen des Embryos nach Embryonentransfer (Gruppe 2), die zum Teil auch zusätzlich Aborte in der Frühschwangerschaft erlitten hatten (Gruppe 3). Die fibrinolytischen Parameter PAI-1, t-PA und Fibrinogen wurden kontinuierlich bestimmt. Sarto et al. (2000) konnten in über 50% aller Patientinnen eine Hyperfibrinolyse aufdecken. Das Ergebnis scheint darauf hinzudeuten, dass eine abnorm gesteigerte fibrinolytische Aktivität Einfluß auf die Genese wiederholter, unklarer früher Schwangerschaftsverluste und früher Reproduktionsfehlschläge haben könnte.

4.4. Angiotensin-Converting Enzym-Polymorphismus

Wie bereits dargestellt (siehe Kap. 1.3.4.2.), liegt beim Auftreten des D-Allels des ACE-D/I-Polymorphismus ein erhöhter ACE-Plasmaspiegel vor, welcher indirekt via Angiotensin II ebenfalls zu einer verstärkten PAI-1-Expression führt (Margaglione et al., 1997, Iwai et al., 1998). Folge ist eine verstärkte Bildung von thrombotischen

Gerinnseln. Matsubara et al. (2000) bezeichneten den ACE-Polymorphismus auch als Regulator der PAI-1-Aktivität.

Betrachtet man die Verteilung des ACE-Polymorphismus zwischen RSA-Patientinnen und Kontrollen, so lässt sich ein deutlicher Schwerpunkt des D/D-Genotyps bei den Patientinnen erkennen. Dies legt die Vermutung nahe, dass der in Veröffentlichungen beschriebene thrombosesteigernde Effekt dieses Genotyps (Margaglione et al., 1997, Iwai et al., 1998) wahrscheinlich auch Einfluß auf die Entstehung rezidivierender Aborte nimmt. Zu gleicher Ansicht kam die Arbeitsgruppe von Fatini et al. (2000). Untersucht wurden 59 Frauen mit drei oder mehr Aborten innerhalb des ersten Trimenons sowie 70 gesunde Frauen mit komplikationslosen Schwangerschaftsverläufen. Es konnte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem ACE-D/D-Genotyp und frühen Schwangerschaftsverlusten darlegt werden, so dass der ACE-D/D-Genotyp als Risikofaktor für Fehlgeburten deklariert wurde (Fatini et al., 2000).

Umgekehrt fanden wir in unseren Untersuchungen den D/I-Genotyp häufiger bei den Kontrollfrauen. Man könnte die Spekulation anstellen, dass das I-Allel -als Gegenstück zum D-Allel- theoretisch aufgrund einer gesteigerten Plasminaktivität zu einer Hyperfibrinolyse führen kann (siehe Kap. 1.3.4.2.). Die entgegengesetzten Wirkungen des thrombophilen D-Allels zum einen und des fibrinolysefördernden I-Allels zum anderen scheinen sich aufzuheben und den D/I-Genotyp zu einer Variante der Durchschnittsbevölkerung zu machen, ohne merklichen Einfluß auf die hämostaseologischen Geschehnisse. Diese Vermutung wird durch die in Kap.4.3. beschriebene Arbeit von Margaglione et al. (1998c) gestützt. Sie berichteten über die Unabhängigkeit des ACE-D/I-Genotyps von der PAI-1-Plasmakonzentration.

Alles in allem zeigten sich aber bei Betrachtung sowohl des D/D- als auch des D/I-Genotyps statistisch nur geringe Unterschiede, so dass die Ergebnisse als weiter zu verifizierende Tendenzen zu werten sind.

Bei Analyse des I/I-Genotyps ließ sich eine gleichmäßige Verteilung auf die Gruppe der Patientinnen und Kontrollen feststellen. Die vermutete fibrinolytische Wirkung des I-Allels machte sich bei unseren Untersuchungen anscheinend nur in einer Abschwächung des D-Allels im D/I-Genotyp bemerkbar. Die Auffassung, dass der Einfluß des I/I-Genotyps auf rezidivierende Spontanaborte von geringerer Bedeutung

ist, schließt sich der Beobachtung von Kimura et al. (1998) an. Das Team konnte in seinen Arbeiten über diabetische Nephropathie und Makroangiopathie ebenso keine Signifikanzen für den I/I-Genotyp nachweisen. Das Studienkollektiv enthielt 208 Patienten mit nicht-insulinabhängigen Diabetes mellitus von über 15 Jahren Dauer. Manifeste Makroangiopathie wurde durch körperliche und klinische Zeichen als auch durch Laboruntersuchungen diagnostiziert. In Publikationen herrscht nicht immer einheitliche Meinung über den ACE-I/I-Genotyp. Iwai et al. (1998) analysierten den D/I-Polymorphismus des ACE-Gens bei 320 Patienten mit angiographisch bestätigter ischämischer Herzerkrankung. Sie fanden, dass der ACE-I/I-Genotyp mit einem verlängertem Zeitintervall zwischen dem ersten pectanginösem Schmerz und der tatsächlichen Manifestation des Herzinfarktes assoziiert war. Da der I/I-Genotyp möglicherweise mit einer erhöhten Plasminaktivität und Fibrinolyseaktivität einhergeht, deutete diese Arbeitsgemeinschaft den Genotyp als Fibrinolysemarker (Iwai et al., 1998).

4.5. PAI-1-Polymorphismus in Kombination mit dem ACE-Polymorphismus

Der Zusammenhang zwischen dem Angiotensin-Converting Enzym und der PAI-1-Expression via des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems (RAAS) wurde in Kap. 1.3.4.2., 1.3.5. und 4.4. dargestellt. Vermutungen wurden bereits angestellt, dass möglicherweise sowohl der ACE-D/D-Genotyp als auch der PAI-1-4G/4G-Genotyp trotz unterschiedlicher Angriffspunkte, synergistisch zu erhöhten PAI-1-Plasmaspiegeln führen könnten (Margaglione et al., 1997, Kimura et al., 1998, Wong et al., 2000).

Die Arbeitsgruppe von Margaglione et al. (1997) suchte nach einem Zusammenhang zwischen dem PAI-1-4G/5G-Polymorphismus und dem ACE-D/I-Polymorphismus. Es wurden 208 Männer und Frauen im Alter zwischen 31 und 86 Jahren in die Erhebung eingeschlossen. Die Patienten mit atherosklerotischem Gefäßleiden mussten mindestens einen Risikofaktor, wie Diabetes mellitus, erhöhte LDL-Cholesterinwerte, Rauchen oder familiäre Belastung mit einer kardiovaskulären Erkrankung aufweisen.

Es fanden sich bei den Patienten, bei denen sowohl der ACE-D/D-Genotyp als auch der PAI-1-4G/4G-Genotyp vorlag erhöhte PAI-1-Plasmawerte, so dass über eine mögliche Interaktion zwischen beiden Genotypen in Kombination spekuliert werden konnte.

Zu fast identischer Ansicht kam auch die Gruppe von Kimura et al. (1998). Diese bereits in Kap. 4.4. beschriebene Studie von Kimura et al. (1998) untersuchte neben dem ACE-Polymorphismus auch den PAI-4G/5G-Polymorphismus und dessen gegenseitiges Zusammenspiel im Sinne eines additiven Effektes. Es zeigten sich bei den diabetischen Patienten, bei denen sowohl der D/D-Genotyp als auch der 4G/4G-Genotyp vorlag, vermehrt diabetische Nephropathien und Makroangiopathien. Sie konnten also die These bestätigen, dass der ACE-D/D-Genotyp sowie der PAI-4G/4G-Genotyp sich in ihrer Wirkung gegenseitig unterstützen können und letztendlich zu erhöhten PAI-1-Plasmaspiegeln führen, obwohl beide unterschiedliche Angriffsstellen der Fibrinolyse haben (Kimura et al., 1998).

In den beiden geschilderten Arbeiten zeichneten sich jedoch nur Tendenzen ab. Signifikante Ergebnisse lagen nicht vor. Wong et al. (2000) gelang es dagegen in Analysen über diabetische Nephropathie signifikante Unterschiede nachzuweisen. Es wurden ebenfalls Typ-2-Diabetiker mit manifester diabetischer Nephropathie einbezogen. Die 141 chinesischen Patienten litten im Durchschnitt 14 Jahre an der Zuckerkrankheit. Ein signifikantes Mehrauftreten diabetischer Nephropathien bei gleichzeitigem Vorliegen des ACE-D/D-Genotyps und des PAI-1-4G/4G-Genotyps konnte dargelegt werden.

In Widerspruch dazu gibt es auch Publikationen, die ein Zusammenwirken des ACE-Genotyps und der PAI-1-Aktivität bestreiten (Jeng et al., 1998, Seino et al., 1998). Diesbezüglich sollen die Recherchen von Jeng et al. (1998) sowie von Seino et al. (1998) diskutiert werden. Beide Arbeitsgruppen suchten nach einer möglichen Assoziation zwischen einem ACE-Genotyp und der damit einhergehenden PAI-1-Expression. Jeng et al. (1998) wählten 160 chinesische Personen mit milder bis mäßiger Hypertonie als Analysekollektiv. Es wurden keine erhöhten PAI-1-Level dokumentiert, auch nicht bei Vorliegen des ACE-D/D-Genotyps. Infolgedessen stellten Jeng et al. (1998) den Einfluß des ACE-Polymorphismus auf die PAI-1-Plasmaaktivität und die Fibrinolyse im Zusammenhang mit Hypertension in Frage. Seino et al. (1998) nahmen eine kleinere Patientenzahl von n=26 mit stattgehabten

ischämischen Zerebralinfarkten und 28 gesunde Kontrollpersonen. Es konnten ebenfalls keine veränderten PAI-1-Spiegel in Abhängigkeit eines bestimmten ACE-Genotyps gefunden werden, so dass auch im Bezug auf zerebrale Infarkte eine Assoziation zwischen dem ACE-Polymorphismus und PAI-1-Plasmawerten verneint wurde (Seino et al., 1998).

Da die beiden Polymorphismen des PAI-1-Gens und des ACE-Gens mit verschiedenen Angriffsorten zu einer gemeinsamen Einflußgröße für die Plasminaktivität werden, haben wir die Kombinationen beider Parameter in unserer RSA-Patientengruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe untersucht.

4.5.1. PAI-4G/4G in Kombination mit dem ACE-D/D

Bei unseren Ergebnissen stach die Kombination aus dem PAI-4G/4G-Genotyp und dem ACE-D/D-Genotyp am deutlichsten heraus. Für diese Kombination gelang es uns, einen statistisch hoch signifikanten Unterschied zwischen Frauen mit rezidivierenden Spontanaborten und Frauen ohne rezidivierende Spontanaborte nachzuweisen.

Die thrombophile Wirkung des PAI-1-4G/4G- und auch des ACE-D/D-Genotyps als mögliche Gefahr für wiederholte Schwangerschaftsverluste deutete sich bereits bei getrennter Genotypanalyse an. In der plazentaren Strombahn könnte also das Zusammenwirken des 4G/4G-Genotyps und des D/D-Genotyps einen bedeutenden thrombosesteigernden Effekt haben. Die synergistischen Einzelwirkungen scheinen sich gegenseitig zu verstärken, möglicherweise sogar zu potenzieren; statistisch waren die Unterschiede hoch signifikant. Sowohl das D-Allel als auch das 4G-Allel resultieren in einer erhöhten PAI-1-Plasmakonzentration. Diese hemmt ihrerseits aufgrund einer herabgesetzten Plasminaktivität die Fibrinolyse, was zu einer vermehrten Thrombenbildung führt (siehe Kap. 1.3.4.2 Abb.8). Im Endeffekt wird die hämostaseologische Feinabstimmung gestört, die jedoch für eine regelhafte uteroplazentare Entwicklung unerlässlich ist.

Insofern ist zu sagen, dass die in Veröffentlichungen vermutete thrombosefördernde Wirkung des PAI-1-4G/4G-Genotyps in Kombination mit dem ACE-D/D-Genotyp (Margaglione et al., 1997, Kimura et al., 1998, Wong et al., 2000) nach unseren Daten eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese rezidivierender Spontanaborte

spielt. Wahrscheinlich stellt gerade das gleichzeitige Vorliegen beider Genotypen einen beachtlichen Risikofaktor dar. Außerdem stützen unsere Ergebnisse die sich entwickelnde Auffassung, dass möglicherweise bestimmte Kombinationen von Polymorphismen mehr Einfluß auf die Entstehung hämostaseologischer Dysregulationen haben als einzelne Polymorphismen.

4.5.2. PAI-4G/5G in Kombination mit dem ACE-D/I

Weitere Beachtung fand die Kombination aus dem PAI-1-4G/5G-Genotyp und dem ACE-D/I-Genotyp (PAI-1-4G/5G+ACE-D/I). Zunächst sei nochmals erinnert, dass bei Einzelanalyse und separater Betrachtung sowohl der PAI-1-4G/5G-Genotyp (siehe Kap. 4.3.) als auch der ACE-D/I-Genotyp (siehe Kap. 4.4.) bei den Kontrollen bedeutend öfter vorlag. Auch von Margaglione et al. (1998c) wurden beide Genotypen als unabhängige Faktoren von der PAI-1-Konzentration deklariert. Übereinstimmend mit unseren Erwartungen und Mutmaßungen war auch die Kombination aus diesen beiden Genotypen in dem gesunden Vergleichskollektiv signifikant häufiger zu finden.

Dieses insgesamt schlüssige Ergebnis entsprach unseren Vermutungen und bestätigt folgerichtig die angestellte Überlegung, dass beide Genotypen allein, sowie in Kombination, gewissermaßen als hämostaseologisch ausgeglichene Faktoren der Durchschnittsbevölkerung ohne bedeutenden Einfluß auf die Entstehung rezidivierender Spontanaborte gewertet werden sollten. Möglicherweise könnten sie sich sogar gegenseitig in ihrer Wirkung verstärken.

4.5.3. PAI-5G/5G in Kombination mit dem ACE-I/I

Der PAI-1-5G/5G-Genotyp soll aufgrund der verminderten PAI-1-Expression und der daraus resultierenden vermehrten Plasminaktivität zu einer Zersetzung extrazellulärer Matrix führen. Somit könnte also eine Hyperfibrinolyse entstehen (siehe Kap. 1.3.3.2.), wobei wir diese bei Einzelanalyse des 5G/5G-Genotyps nicht eindeutig belegen konnten (siehe Kap. 4.3.). Bei separater Auswertung des ACE-I/I-Genotyps ließ sich ebenso keine unterschiedliche Verteilung zwischen unseren beiden Kollektiven feststellen (siehe Kap. 4.4.). Die vermutete hyperfibrinolytische Wirkung des I-Allels, die theoretisch aus der gesteigerten Plasminaktivität resultieren

könnte (siehe Kap. 1.3.4.2.), spielt anscheinend eine untergeordnete Rolle bei der Genese der wiederholten Schwangerschaftsverluste.

Für die Kombination des PAI-1-5G/5G-Genotyps mit dem ACE-I/I-Genotyp fanden wir bei unseren Untersuchungen nur geringfügige Unterschiede in der Genotypenverteilung. Eine richtungsweisende Tendenz ließ sich nicht erkennen. Auch die Kombination scheint also keine Auswirkungen auf den Schwangerschaftsverlauf zu haben, wie vielleicht aufgrund der vermuteten, jedoch immer noch fraglichen, synergistischen Einzelwirkungen des I-Allels und des 5G-Allels (siehe Kap. 4.3. und Kap. 4.4) zu erwarten hätte sein können. Dementsprechend können wir aus unseren Ergebnissen keinen relevanten Effekt der Kombination des 5G/5G-Genotyps mit dem I/I-Genotyp auf die Entstehung rezidivierender Spontanaborte ableiten.

Insofern bestätigt sich möglicherweise die Vorstellung, dass der PAI-1-5G/5G-Genotyp und der ACE-I/I-Genotyp einen zu schwachen Einfluß auf die Fibrinolyse haben könnten, um den erfolgreichen und unproblematischen Verlauf einer Schwangerschaft zu gefährden. Letztlich bleiben dies aber Vermutungen, die in weiteren Untersuchungen mit höheren Fallzahlen verifiziert werden müssen.

4.5.4. PAI-Genotypen in Kombination mit den restlichen ACE-Genotypen

Betrachtet man die Kombination des PAI-1-5G/5G-Genotyps mit dem ACE-D/D-Genotyp, so ergaben sich keine erwähnenswerten Unterschiede oder Tendenzen in der Genotypenverteilung zwischen RSA-Patientinnen und Kontrollen. Die möglichen entgegengesetzten Effekte des thrombosesteigernden D/D-Genotyps einerseits und des fraglich fibrinolytisch wirkenden 5G/5G-Genotyps andererseits erwecken den Anschein, sich gegenseitig aufzuheben.

Die Kombination aus dem PAI-1-5G/5G-Genotyp und dem ACE-D/I-Genotyp war ebenfalls gleichmäßig auf beide Studiengruppen verteilt. Die Häufung des D/I-Genotyps in der Kontrollgruppe, die sich bei der Einzelanalyse zeigte, ließ sich nicht mehr nachweisen. Hierfür könnte man als denkbare Erklärung womöglich eine abschwächende Wirkung des 5G/5G-Genotyps verantwortlich machen.

Bei gleichzeitigem Vorliegen des PAI-4G/4G-Genotyps und des ACE-D/I-Genotyps, scheint der vermutete thrombosefördernde Effekt des 4G/4G-Genotyps nicht mehr

zum Tragen zu kommen. Wir fanden eine nahezu homogene Verteilung der Kombination. Diese Tatsache könnte eventuell dadurch erklärt werden, dass die thrombotische Wirkung des 4G/4G-Genotyps unter Umständen durch den D/I-Genotyp, wahrscheinlich einem Faktor ohne bedeutenden hämostaseologischen Einfluß aufgehoben worden ist.

Das Zusammenspiel des PAI-4G/4G-Genotyps mit dem ACE-I/I-Genotyp zeigte erwartungsgemäß ebenso keine bedeutenden Schwerpunkte oder Tendenzen in der Genotypenverteilung zwischen Patienten und Kontrollen. Die möglichen antagonistischen Effekte des thrombophilen 4G/4G-Genotyps zum einen und des fraglich hyperfibrinolytischen I/I-Genotyps zum anderen könnten ihre entgegengesetzten Wirkungen beiderseits ausgeglichen haben.

Auch die weitere Kombination des PAI-1-4G/5G mit dem ACE-I/I ließ keine richtungsweisende Tendenz erkennen. Dementsprechend bestätigen sich die Vorstellungen, dass der I/I-Genotyp vielleicht einen zu geringen Einfluß auf die Fibrinolyse ausübt, um einen komplikationslosen Schwangerschaftsverlauf zu gefährden und der 4G/5G-Genotyp wahrscheinlich keinen ausschlaggebenden Effekt auf die Feinabstimmung des hämostaseologischen Gleichgewichts verursacht.

Untersucht man das Zusammenwirken des PAI-4G/5G-Genotyps und des ACE-D/D-Genotyps, so fand man die Kombination im Kontrollkollektiv etwas häufiger. Die thrombosesteigernde Wirkung des D/D-Genotyps könnte womöglich durch den 4G/5G-Genotyp abgeschwächt worden sein.

Alles in allem ist zu sagen, dass die Ergebnisse durch höhere Fallzahlen in weiteren Auswertungen zu überprüfen sind.

4.6. Abortmechanismen

Die anamnestisch erhobenen Abortmechanismen wurden registriert und in die zugehörige Gruppe eingeordnet. Wir bildeten nach pathogenetischen Gesichtspunkten Gruppen für Blutungskomplikationen/Abortus incompletus, missed abortion/intrauteriner Fruchttod (IUFT), Abortivei, vorzeitiger Blasensprung/premature rupture of the membranes (PROM) und embryonale

Chromosomenstörung/Genabnormalität. Verstärkte Blutungen und Blutungsstörungen sind häufig klinische Manifestation eines Abortus incompletus. Bei der Gruppe missed abortion bzw. intrauteriner Fruchttod werden Mikrozirkulationsstörungen und eine erhöhte Thromboseneigung als pathogenetische Ursache diskutiert. Abortiveier resultieren zumeist aus einer regelwidrigen Schwangerschaftsanlage oder hormoneller Dysregulation. Bei der Gruppe vorzeitiger Blasensprung/PROM liegen häufig Infektionen als Ursache zugrunde. Im Rahmen der genetisch determinierten Abortursachen im Schwangerschaftsprodukt handelt es sich in den überwiegenden Fällen um Chromosomenstörungen aufgrund von chromosomaler Fehlverteilung (siehe Kap. 1.3.6., 2.2.).

Da der PAI-1-Polymorphismus und der ACE-Polymorphismus bedeutende Einflussfaktoren im Rahmen einer hypo- beziehungsweise hyperfibrinolytischen Wirkung zu sein schienen, wurde der Zusammenhang zwischen den PAI-1-4G/5G-Genotypen sowie den ACE-D/I-Genotypen und den Abortmechanismen Blutungskomplikation/Abortus incompletus (verstärkte Blutung), missed abortion/intrauteriner Fruchttod (Verdacht auf Mikrozirkulationsstörung), Abortivei (Verdacht auf Anlagestörung), vorzeitiger Blasensprung/PROM (Verdacht auf Infektion) und embryonale Chromosomenstörung/Genabnormalität untersucht.

4.6.1. Abortmechanismus Blutungskomplikation / Abortus incompletus

Bei den registrierten Schwangerschaftsverlusten, die mit Blutungskomplikationen bzw. Abortus incompletus einhergingen, ließ sich sowohl der PAI-1-5G/5G-Genotyp als auch der ACE-I/I-Genotyp signifikant häufiger nachweisen.

Eine mögliche Erklärung für die Korrelation des PAI-5G/5G-Genotyps sowie des ACE-I/I-Genotyps mit dem Abortus incompletus könnte der bei beiden Genotypen vermutete gleichartige Effekt auf die fibrinolytische Aktivität im Sinne einer hyperfibrinolytischen Dysregulation sein. Die bei beiden Genotypen möglicherweise entstehende erhöhte Plasminaktivität (siehe Kap. 1.3.3.2., 1.3.4.2.) könnte zu einer unverhältnismäßigen Zersetzung extrazellulärer Matrix führen. Die Folge sind Gewebeauflockerungen und eine Destabilisierung des Plazentagerüsts. Aufgrund der daraus resultierenden ungenügenden uteroplazentaren Wechselwirkungen, könnte es verständlicherweise leichter zum Absterben, Ablösen und nachfolgender

Ausstoßung von Teilen des Schwangerschaftsproduktes kommen, was als Abortus incompletus bezeichnet wird. Mittelstarke bis starke Blutungen begleiten zumeist das Geschehen.

Das deutlich vermehrte Auftreten des ACE-D/I-Genotyps bei den Aborten mit anderen ursächlichen Mechanismen als Blutungskomplikationen könnte möglicherweise als statistisches Phänomen interpretiert werden. Bei der Auswertung wurden alle anderen registrierten Abortmechanismen zusammengefasst und dem analysierten Mechanismus Blutungskomplikationen/Abortus incompletus gegenüber gestellt. Dadurch könnte sich das Ergebnis unter Umständen aufgrund der Kumulation potenziert haben. Ähnliche Tendenz deutete sich bei Analyse des PAI-1-Polymorphismus an. Hier zeigte sich der PAI-4G/5G-Genotyp ebenso etwas häufiger bei den Fehlgeburten mit anderen ursächlichen Mechanismen als verstärkte Blutungen.

Der PAI-1-4G/4G-Genotyp ließ sich bei den Fehlgeburten mit verstärkten Blutungen seltener feststellen als bei den Fehlgeburten mit anderen Mechanismen. Dieses Ergebnis unterstützt indirekt die Auffassung, dass der PAI-1-4G/4G-Genotyp ein beachtlicher thrombophiler Risikofaktor ist.

Da wir bei den angestellten Erhebungen und Analysen zu den Blutungskomplikationen bzw. dem Abortus incompletus in den allermeisten Fällen auf die anamnestischen Angaben und die Compliance der Patientinnen angewiesen waren, bleibt zu bedenken, dass es zu Ergebnisverzerrungen gekommen sein könnte. Bei den beobachteten Blutungen könnte es sich zum Beispiel auch um Pseudomenstruationen, Nidationsblutungen oder Schmierblutungen gehandelt haben, die von der Patientin falsch oder ungenau dargelegt wurden. Theoretisch wäre es also möglich, dass die anamnestisch erhobenen Blutungskomplikationen in unseren Daten überrepräsentiert sind.

4.6.2. Abortmechanismus Missed Abortion / Intrauteriner Fruchttod

Im Falle des Abortmechanismus missed abortion/intrauteriner Fruchttod (IUFT) zeigte sich der PAI-1-5G/5G-Genotyp signifikant seltener und der ACE-I/I-Genotyp hoch signifikant seltener bei den Aborten mit ursächlichem missed abortion/IUFT als bei der Gruppe der anderen ursächlichen Abortmechanismen. Folglich scheinen

beide Genotypen keinen relevanten Einfluss auf mikrothrombotische Vaskularisationsstörungen zu haben, wie sie bei der Pathogenese des missed abortion und des intrauterinen Fruchttodes (IUFT) diskutiert werden. Damit bestätigt sich indirekt der Gedanke, dass der PAI-1-5G/5G-Genotyp und der anscheinend gleichartig wirkende ACE-I/I-Genotyp keine thrombophile Komponente haben und möglicherweise für Blutungskomplikationen mitverantwortlich sein könnten (siehe Kap. 1.3.3.2., 1.3.4.2., 4.6.1.).

Umgekehrt trat der ACE-D/I-Genotyp bei Schwangerschaftsverlusten mit missed abortion oder intrauterinem Fruchttod hoch signifikant häufiger auf. Bei dem PAI-1-Polymorphismus wurde ein tendenzielles Mehrauftreten des PAI-4G/5G-Genotyps bei Fehlgeburten bedingt durch missed abortion/IUFT festgestellt. Es zeigte sich demnach eine Assoziation mit Genotypen, denen kein ausschlaggebender Effekt auf das hämostaseologische Geschehen zugeschrieben wird. Infolgedessen könnte man die Spekulation anstellen, dass es womöglich einen weiteren entscheidenden, nicht berücksichtigten Faktor gibt. Möglicherweise leistet auch die Genotypenkombination des Embryos einen Beitrag zum Abortgeschehen, was hier bisher nicht berücksichtigt ist, so dass zwischen einer vom Embryo ausgehenden Durchblutungsstörung und einer von der Mutter ausgehenden Durchblutungsstörung zu unterscheiden wäre.

Auch ließ sich der PAI-1-4G/4G-Genotyp etwas häufiger bei den Schwangerschaftsverlusten aufgrund von Mikrozirkulationsstörungen oder übermäßiger Thrombenbildung registrieren. Dies unterstützt wiederum die Theorie, dass der PAI-4G/4G-Genotyp ein bedeutender thrombophiler Einflussfaktor ist.

4.6.3. Abortmechanismus Abortivei

Beim Abortivei, auch Windei genannt, handelt es sich um ein fehlentwickeltes Ei mit verkümmerter oder fehlender Embryonalanlage (Stauber et Weyerstahl, 2001). Infolge einer mangelhaften Ausbildung der Zottengefäße geht die Embryonalanlage zugrunde, während Trophoblast und Eihüllen noch einige Tage bis Wochen erhalten bleiben (Martius et al., 1996).

Bei unseren Untersuchungen fanden wir den ACE-I/I-Genotyp deutlich häufiger bei den mit Abortivei einhergehenden Schwangerschaftsverlusten als bei den Aborten mit anderen ursächlichen Mechanismen. Wie bereits dargestellt (siehe Kap. 1.3.4.2.,

4.4., 4.5.) resultiert vermutlich die hyperfibrinolytische Wirkung des I-Allels aus einer gesteigerten Plasminaktivität. Die entstehende, übermäßige Gewebszersetzung stört unter Umständen auch die adäquate Formierung der Zottengefäße, welche jedoch für eine adäquate Entwicklung des Embryoblasten unerlässlich sind. Auch dies könnte Einfluss nehmen auf die Fehlentwicklung des Eies mit verkümmerter oder ganz fehlender Embryonalanlage.

Weiterhin zeigte sich ein klares Mehrauftreten des ACE-D/I-Genotyps und ein angedeutetes Mehrauftreten des PAI-1-4G/5G-Genotyps bei Fehlgeburten mit anderen Mechanismen als einem Abortivei. Diese Befunde kommen mit der Ansicht überein, dass es sich bei beiden Genotypen um alltägliche Normvarianten der Bevölkerung handelt.

Die Ergebnisse müssen aber vor dem Hintergrund der geringen Fallzahl mit großer Vorsicht interpretiert werden. Die möglichen Ursachen der niedrigen Fallzahl sollen kurz diskutiert werden. Zum einen ist zu berücksichtigen, dass diese Anlagestörung schon in den ersten Wochen der Schwangerschaft auftritt und gelegentlich unbemerkt verläuft. Das heißt es könnte möglich sein, dass unter Umständen das Vorliegen eines Abortiveies der Diagnostik entgangen ist. Da das Geschehen zudem manchmal auch mit Schmierblutungen einhergeht, könnte es zum anderen sein, dass der Abort fälschlicherweise der Gruppe der Blutungskomplikationen zugeordnet wurde.

Es ergeben sich also auch hier mögliche anamnestische Probleme und potentielle Fehlerquellen, so dass eventuell der Mechanismus Abortivei in unserer Datenerhebung unterrepräsentiert ist.

Letztlich bleibt anzumerken, dass die Pathogenese des noch jungen Schwangerschaftsproduktes vielfältig ist. Anomalien der Anlage können genetisch bedingt sein, aber auch in Form von Gameto- und Blastopathien auftreten. Schließlich können sie Folge von „Umweltschäden“ im Sinne ungünstiger Nidationsbedingungen (Endometriuminsuffizienz) oder einer immunologischen Abstoßreaktion sein. So ist es im Einzelfall häufig nicht möglich, zu einer ausreichend sicheren kausalen Differenzierung zu kommen (Martius et al., 1996).

4.6.4. Abortmechanismus Vorzeitiger Blasensprung / PROM

In der Gruppe vorzeitiger Blasensprung/premature rupture of the membranes (PROM) wurden in unserem Kollektiv, welches sich überwiegend aus Fehlgeburten des 1. Trimenons rekrutierte, zu wenig Fälle verzeichnet, um Ergebnisse hinreichend interpretieren zu können. Dies könnte zum einen möglicherweise daher kommen, dass ein vorzeitiger Blasensprung eher ein Geschehen der Spätschwangerschaft ist. Zum anderen kann ein PROM auch unter Umständen gleichzeitig mit Blutungen auftreten. Aus diesen Gründen könnte es also möglich sein, dass das Ereignis mehrfach unserer anamnestischen Datensammlung entgangen ist oder wiederholt fehlgedeutet wurde.

4.6.5. Abortmechanismus Chromosomenstörung / Genabnormalität

Im Rahmen der genetisch determinierten Abortursachen muss unterschieden werden, ob die genetische Abweichung in den elterlichen Chromosomensätzen verankert ist oder ob eine Chromosomenveränderung im Schwangerschaftsprodukt vorliegt. Wie Untersuchungen am Abortmaterial darlegten, handelt es sich in den überwiegenden Fällen um embryonale Chromosomenstörungen, insbesondere aufgrund von chromosomalen Fehlverteilungen (Carp et al., 2001, Daniely et al., 1998) (siehe Kap. 1.1.3.). Demzufolge erfassten wir Chromosomenveränderungen im Schwangerschaftsprodukt. Ein Zusammenhang zum mütterlichen Genotyp der Polymorphismen kann nicht hergestellt werden.

4.7. Schlussfolgerung

Mit der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass einzelne Genveränderungen und besonders auch die Kombination derer Einfluß auf den Verlauf einer Schwangerschaft nehmen können.

Als therapeutische Konsequenz auch während einer Schwangerschaft, steht beim Vorliegen einer erhöhten Thromboseneigung eine prophylaktische Behandlung mit niedermolekularem Heparin zur Wahl (Schambeck et al., 2001). Heparin verhindert die Fibrinbildung während des Gerinnungsprozesses, indem es die

Gerinnungskaskade unterbricht. Das Heparin wirkt dabei durch Komplexbildung mit dem Antithrombin III (AT III). Es werden zahlreiche Gerinnungsenzyme inaktiviert, wobei Thrombin und Faktor Xa am empfindlichsten sind. Zudem hemmt das AT III die Umwandlung von Prothrombin zu Thrombin.

Darüber hinaus ist die Gabe von niedrigdosierter Acetylsalicylsäure (ASS), zur Vermeidung einer thrombozytenaggregatorischen Wirkung zu überlegen (Rai et al., 2000, Vaquero et al., 2001). ASS ist ein irreversibler und unselektiver Cyclooxygenase-Inhibitor. In den Thrombozyten kommt es zu einer verminderten Synthese von Prostaglandinen und Thromboxan. Dadurch wird die Thrombozytenaktivierung unterdrückt und infolgedessen auch die Thrombozytenaggregation. Der Plättchenrezeptor, an den Fibrinogen bindet ist der Glykoprotein IIb/IIIa-Rezeptor.

Insgesamt ergeben sich aufgrund der beiden verschiedenen Wirkmechanismen unterschiedliche Indikationen zum therapeutischen Einsatz. Bei pathologisch gesteigerter Thrombozytenagglutination, welche möglicherweise durch den Glykoprotein-IIIa-Polymorphismus oder den Beta-Fibrinogen-Polymorphismus bedingt sein könnte, ist eine prophylaktische Therapie mit ASS zu befürworten. Die Therapie mit niedermolekularem Heparin ist Mittel der Wahl bei Koagulopathien und übermäßiger Fibrinbildung. In diesem Zusammenhang ist an Polymorphismen in Gerinnungsenzymen und an Mutationen, die in die Gerinnungskaskade eingreifen zu denken. Bei gleichzeitigem Vorliegen des PAI-4G/4G-Genotyps und des ACE-D/D-Genotyps wäre in jedem Fall eine Prophylaxe zu erwägen, um die synergistischen thrombophilen Wirkungen beider Genotypen abzuschwächen. Gerade die Kombination könnte ein bedeutender Risikofaktor bei der Pathogenese wiederholter Spontanaborte sein.

Außerdem muss man berücksichtigen, dass im Rahmen der hämostaseologischen Geschehnisse auch nicht genetisch festgelegte Einflüsse sowie Umweltfaktoren eine beachtliche Rolle spielen können. Zum Beispiel beeinflussen den PAI-1-Plasmaspiegel, der eine regulatorische Schlüsselfunktion übernimmt, auch Faktoren wie Rauchen, Alkohol und das männliche Geschlecht (Margaglione et al., 1998c; siehe Kap. 4.3.). Humphries et al. (1997) zeigten, dass körperliche Aktivität und der Triglyceridstatus auf die PAI-1-Konzentration nicht unerheblich einwirken können.

Alles in allem bleibt zu erwähnen, dass eine Beeinträchtigung eines regelhaften Schwangerschaftsverlaufs wahrscheinlich nicht ausschließlich aus der entsprechenden Wirkung einzelner Genveränderungen abzuleiten ist. Vielmehr scheint das gleichzeitige Vorliegen mehrerer Polymorphismen zusammen das Risiko für rezidivierende Spontanaborte entscheidend zu erhöhen. Dies führt im Grunde dazu, dass Kombinationen und das Zusammenspiel einzelner Faktoren betrachtet werden sollten, die auf der einen Seite auf die Fibrinolyse und auf der anderen Seite auf die Gerinnungskaskade beziehungsweise Thrombenbildung einwirken.

Es handelt es sich also um ein multifaktorielles Geschehen, das das fragile hämostaseologische Gleichgewicht störend beeinflussen kann. Eine exakte Feinabstimmung der fibrinolytischen und thrombotischen Prozesse scheint für eine erfolgreiche Implantation und komplikationslose uteroplazentare Entwicklung unerlässlich. Einerseits muss die Fibrinpolymerisation und damit die Stabilisierung der plazentaren Basalplatte erfolgen. Andererseits aber muss eine optimale Perfusion der intervillösen Räume und plazentaren Strombahn sichergestellt werden.

5. Zusammenfassung

Mit unseren Untersuchungen auf thrombophile Genmutationen bei idiopathischen rezidivierenden Spontanaborten ist das diagnostische Spektrum dieser bisher noch teilweise frustrierenden Abklärung erweitert worden. Mutationen und Polymorphismen in Genen der Gerinnungskaskade sowie in Faktoren der Fibrinolyse stehen seit geraumer Zeit im Fokus für das Auftreten von Thrombosen und Gerinnungsstörungen.

In der vorliegenden Arbeit wurden bereits bekannte Polymorphismen von Gerinnungsfaktoren und Polymorphismen der Fibrinolysekaskade bei Patientinnen mit rezidivierenden Spontanaborten unklarer Genese untersucht und die Genotypenverteilungen zwischen Patientinnen und Kontrollen verglichen.

Das Vorliegen vermehrten thrombotischen Materials in abortierten Plazenten sowie das Auftreten rezidivierender starker Blutungen ließen die Assoziation mit grundlegenden Gerinnungsstörungen vermuten. Diese sind möglicherweise aufgrund der resultierenden fetalen Minderperfusion und Hypoxie für die Entstehung der wiederholten Fehlgeburten verantwortlich zu machen.

Die analysierten Faktoren spielen bei der Regulation und Kontrolle des Gleichgewichtes zwischen Hämostase und Fibrinolyse, welches für einen komplikationslosen Schwangerschaftsverlauf unerlässlich ist, eine bedeutende Rolle.

Bei der Untersuchung des **GP1IIa-PIA₁/PIA₂-Polymorphismus** ließen sich keine aussagekräftigen Unterschiede in der Genotypverteilung zwischen RSA-Patientinnen und Kontrollen nachweisen. Daraus könnte man schließen, daß der PIA₁/PIA₂-Polymorphismus wahrscheinlich keine ausschlaggebende Wirkung auf die ursächlichen, hämostaseologischen Phänomene rezidivierender Spontanaborte ausübt. Die fetoplazentare Zirkulation und das Überleben des Embryos scheinen zumindest von diesem Polymorphismus nicht beeinträchtigt zu werden.

Unsere Ergebnisse zum **G/A-Polymorphismus des Beta-Fibrinogen-Gens** deuteten weder im Patienten- noch im Kontrollkollektiv einen Schwerpunkt für einen Genotyp an. Wir können also auch hier über keinen relevanten Effekt des G/A-

Polymorphismus auf wiederholte Schwangerschaftsverluste berichten. Die beschriebene diskrete Erhöhung der Fibrinogenkonzentration bei Vorliegen des A-Allels (Gardemann et al., 1997, de Maat et al., 1998), ist wahrscheinlich nicht ausreichend, um thrombotische Perfusionsprobleme auszulösen, die zu einem Abort führen.

Bei der Analyse des **PAI-1-Polymorphismus** trat, entsprechend unseren Überlegungen und Erwartungen, tatsächlich der 4G/4G-Genotyp häufiger bei den RSA-Patientinnen auf als in der Vergleichsgruppe. Anscheinend führt der 4G/4G-Genotyp also auch bei Frauen mit rezidivierenden Fehlgeburten zu einer verstärkten PAI-1-Expression und folglich verminderten Plasminaktivität. Es resultiert eine erhöhte Thromboseneigung, welche die Gefahr der plazentaren Minderperfusion und einer Störung der uteroplazentaren Einheit in sich birgt. Demzufolge könnte der PAI-4G/4G-Genotyp eine wichtige Rolle bei der thrombotisch bedingten Genese wiederholter Spontanaborte spielen und sollte deshalb als bedeutender, thrombophiler Risikofaktor betrachtet werden.

Die Auswertungen zum **ACE-Polymorphismus** zeigten eine erhöhte Prävalenz des D/D-Genotyps bei den Patientinnen mit wiederholten Schwangerschaftsverlusten. Dies legt die Vermutung nahe, daß der in Veröffentlichungen beschriebene thrombosesteigernde Effekt dieses Genotyps (Iwai et al., 1998) möglicherweise ebenso Einfluß auf die Entstehung rezidivierender Spontanaborte nimmt. Die Vorstellung, dass beim Auftreten des D-Allels ein erhöhter ACE-Plasmaspiegel vorliegt, welcher indirekt via Angiotensin II zu einer verstärkten PAI-1-Aktivität führt (Matsubara et al., 2000, Margaglione et al., 1997), könnte die vermehrte Thromboseneigung plausibel erklären.

Darüber hinaus stützen unsere Untersuchungen die sich entwickelnde These, dass möglicherweise eher **Kombinationen von Polymorphismen**, als einzelne Polymorphismen allein, ein erhöhtes Risiko für das Auftreten von hämostaseologischen Dysregulationen und Gerinnungsstörungen darstellen. Diesen Sachverhalt konnten wir für Spontanaborte an den Polymorphismen im PAI-1- und im ACE-Gen aufzeigen. Da die beiden Polymorphismen mit unterschiedlichen Angriffspunkten synergistisch zu einer gemeinsamen Einflußgröße für die Plasminaktivität werden, haben wir deren Kombination untersucht. Bei unseren

Ergebnissen führte das gleichzeitige Vorliegen des PAI-4G/4G-Genotyps und des ACE-D/D-Genotyps bei den RSA-Patientinnen im Vergleich zu den Kontrollen zu einem vermehrten Auftreten rezidivierender Spontanaborte. Die Kombination (4G/4G+D/D) lag statistisch hoch signifikant häufiger bei den RSA-Patientinnen vor. Sowohl das D-Allel als auch das 4G-Allel resultieren via einer erhöhten PAI-1-Plasmaaktivität in einer herabgesetzten Plasminaktivität (siehe Kap. 1.3.4.2). Im Endeffekt entsteht eine erhöhte Thromboseneigung und damit ein Ungleichgewicht zwischen Hämostase und Fibrinolyse, deren Feinabstimmung jedoch für eine regelhafte uteroplazentare Entwicklung unerlässlich ist. Alles in allem scheinen sich bei Kombination des PAI-4G/4G-Genotyps mit dem ACE-D/D-Genotyp die synergistischen Einzelwirkungen gegenseitig zu verstärken, möglicherweise zu potenzieren und in der plazentaren Strombahn einen relevanten thrombosesteigernden Effekt zu erlangen. Infolgedessen könnte gerade diese Kombination eine entscheidende Rolle bei der Pathogenese rezidivierender Spontanaborte spielen und sollte wohl als bedeutender Risikofaktor für wiederholte Schwangerschaftsverluste angesehen werden.

Der jeden **Abort kennzeichnende Mechanismus** wurde registriert und in Gruppen eingeordnet. Wir bildeten nach pathogenetischen Gesichtspunkten Gruppen für Blutungskomplikationen/Abortus incompletus (verstärkte Blutungen), missed abortion/intrauteriner Fruchttod (Verdacht auf Mikrozirkulationsstörung), Abortivei (Verdacht auf Anlagestörung), premature rupture of the membranes (PROM) bzw. vorzeitiger Blasensprung (Verdacht auf Infektion) und embryonale Chromosomenstörung/Genabnormalität (siehe Kap. 1.3.6., 2.2.). Danach untersuchten wir, ob bestimmte Abortmechanismen mit bestimmten Genotypen assoziiert sind. Nachdem der PAI-1-Polymorphismus und der ACE-Polymorphismus vielversprechende fibrinolytische Einflussfaktoren sind, wurden die Abortmechanismen mit den PAI-1-4G/5G-Genotypen und den ACE-D/I-Genotypen korreliert. Dabei waren für uns die Abortmechanismen Blutungskomplikationen/Abortus incompletus sowie missed abortion/IUFT von besonderem Interesse.

Bei den registrierten Schwangerschaftsverlusten, die mit **Blutungskomplikationen bzw. Abortus incompletus** einhergingen, lag der PAI-1-5G/5G-Genotyp und auch der ACE-I/I-Genotyp signifikant häufiger vor. Eine mögliche Erklärung könnte der

vermutete gleichartige Effekt beider Genotypen auf die fibrinolytische Aktivität im Sinne einer hyperfibrinolytischen Dysregulation sein. Die proteolytische Wirkung und die entstehenden übermäßigen Gewebeauflockerungen könnten eine adäquate Formierung und Stabilisierung des Plazentagerüsts stören, was eine mangelhafte Plazenta-Uterus-Interaktion zur Folge hätte. Es könnte somit leichter zum Absterben, Ablösen und nachfolgender Ausstoßung von Teilen des Schwangerschaftsproduktes kommen. Mittelstarke bis starke Blutungen begleiten zumeist das Geschehen.

Im Falle des Abortmechanismus **missed abortion bzw. intrauteriner Fruchttod (IUFT)** fand sich sowohl der PAI-5G/5G-Genotyp als auch der ACE-I/I-Genotyp signifikant seltener bei den Aborten mit ursächlichem missed abortion/IUFT als bei der Gruppe der anderen Mechanismen. Folglich scheinen beide Genotypen keinen relevanten Einfluss auf mikrothrombotische Vaskularisationsstörungen zu haben, wie sie bei der Pathogenese des missed abortion und des intrauterinen Fruchttodes diskutiert werden. Damit bestätigt sich indirekt der Gedanke, dass der PAI-1-5G/5G-Genotyp und der vermutlich gleichartig wirkende ACE-I/I-Genotyp keine thrombophile Komponente haben und für Blutungskomplikationen mitverantwortlich sein könnten.

Die Ergebnisse der Abortmechanismen können aber vor dem Hintergrund der geschilderten anamnestischen Erhebung nur mit Vorsicht interpretiert werden und müssen daher kritisch beurteilt werden.

Insgesamt konnte mit der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass einzelne Genmutationen und ganz besonders auch die Kombination derer, Einfluss auf den Verlauf einer Schwangerschaft nehmen können. Abschließend bleibt deshalb zu sagen, dass letztendlich das Zusammenspiel einzelner Polymorphismen und Genveränderungen betrachtet werden sollte. Sowohl thrombophile Mutationen in Gerinnungsfaktoren als auch fibrinolytisch wirkende Polymorphismen können das fragile hämostaseologische Gleichgewicht störend beeinflussen. Eine exakte Feinabstimmung der fibrinolytischen und thrombotischen Prozesse scheint für eine erfolgreiche Implantation und komplikationslose uteroplazentare Entwicklung unerlässlich.

6. Anhang

6.1. Datenerfassungsbogen

6.2. Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ACA	Anti-Cardiolipin-Antikörper
ACA IgG	Anticardiolipin Antikörper Typ Immunglobulin G
ACA IgM	Anticardiolipin Antikörper Typ Immunglobulin M
ACE	Angiotensin - Converting Enzym
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
ANA	antinukleäre Antikörper
APA	Anti-Phospholipid-Antikörper
APS	Antiphospholipid-Syndrom
aPTT	aktivierte partielle Thromboplastinzeit
AT III	Antithrombin III
ATP	Adenosintriphosphat
βF	Beta-Fibrinogen
bp	Basenpaare
C	Cytosin
CTP	Cytidintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DHEA-S	Dehydroepiandrosteronsulfat
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
DRVVT	Dilute Russell Viper Venom Time
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
F II	Gerinnungsfaktor II
F V	Gerinnungsfaktor V
F Va	aktivierter Gerinnungsfaktor V
F VII	Gerinnungsfaktor VII
F VIIa	aktivierter Gerinnungsfaktor VII
F VIII	Gerinnungsfaktor VIII
F VIIIa	aktivierter Gerinnungsfaktor VIII
F X	Gerinnungsfaktor X
F Xa	aktivierter Gerinnungsfaktor X
F XII	Gerinnungsfaktor XII
F XIIa	aktivierter Gerinnungsfaktor XII
F XIII	Gerinnungsfaktor XIII
FCXM	anti-paternaler Cross-match
FSH	follikelstimulierendes Hormon
FVL	Faktor V - Leiden (Mutation im Gerinnungsfaktor V)

G	Guanin
GP IIIa	Human Platelet Glykoprotein IIIa
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
H ₂ O dest.	destilliertes Wasser
HA	Herzaktion
HCl	Salzsäure
HLA	humane Leukozytenantigene
Ig G	Immunglobuline vom Typ G
Ig M	Immunglobuline vom Typ M
IU	internationale Units
IUFT	intrauteriner Fruchttod
Kap.	Kapitel
kb	Kilobasen
KCl	Kaliumchlorid
kD	Kilodalton
KHK	koronare Herzkrankheit
Konz.	Konzentration
l	Liter
Leu	Leucin
LH	luteinisierendes Hormon
LMP	low melting point
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität
M	molar
mA	Milliampere
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min.	Minuten
mind.	mindestens
Mio.	Millionen
ml	Milliliter
mM	Millimol
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	mikromolar
mRNA	messenger RNA
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
nm	Nanometer
p	Signifikanzniveau
PAF	plättchenaktivierender Faktor
PAI-1	Plasminogen-Aktivator-Inhibitor - 1
PC	Protein C
PCO	polyzystische Ovarien
PCR	polymerase chain reaction
Pro	Prolin
PROM	premature rupture of membrane

PS	Protein S
PTT	partielle Thrombinzeit
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RNA	Ribonukleinsäure
RR	relatives Risiko
RSA	rezidivierende Spontanaborte
RT	Raumtemperatur
sec.	Sekunden
SERPINS	Serin-Protease-Inhibitor-Superfamilie
SLE	systemischer Lupus erythematodes
SS	Schwangerschaft
SSPS	Statistik-Paket für Social Sciences
SSW	Schwangerschaftswoche
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Taq	Thermus aquaticus
Temp.	Temperatur
TLX-Antigene	Trophoblast-Lymphozyten-kreuzreagierende
t-PA	tissue type plasminogen activator
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tris-HCl	gepufferte Tris - Lösung
TSH	thyreoidstimulierendes Hormon
TTP	Thymidintriphosphat
UV	ultraviolett
vs.	versus
vWF	von Willebrand-Faktor
WHO	World Health Organisation

7. Literaturverzeichnis

Abbas A K, Lichtman A H, Pober J S (1994)

Cellular And Molecular Immunology.

W. B. Saunders Company, Philadelphia

Balasch J, Font J, Lopez-Soto A (1990)

Antiphospholipid antibodies in unselected patients with repeated abortion.

Hum Reprod 5: 43-46

Behague I, Poirier O, Nicaud V, Evans A, Arveiler D, Luc G, Cambou J P, Scarabin P Y, Bara L, Green F, Cambien F (1996)

Beta fibrinogen gene polymorphisms are associated with plasma fibrinogen and coronary artery disease in patients with myocardial infarction. The ECTIM Study. Circulation 93(3): 440-449

Bender H G, Diedrich K, Künzel W (1998)

Klinik der Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Bd. 3. Endokrinologie und Reproduktionsmedizin.

Urban & Schwarzenberg, 4. Auflage

Berrettini M, Lämmle B, Ciavarella G, Ciavarella N (1985)

Functional and immunological studies of abnormal factor XII in a cross reacting material positive (CRM+) factor XII deficiency.

Thromb Haemost 54: 120a (Abstract)

Blumenfeld Z, Brenner B (1999)

Thrombophilia-associated pregnancy wastage.

Fertil Steril 72 (5): 765-774

Braulke I, Pruggmayer M, Melloh P (1993)

Faktor XII (Hageman) deficiency in woman with habitual abortion: new subpopulation of recurrent aborters.

Fertil Steril 59: 98-101

Brenner B, Sarig G, Weiner Z, Younis J, Blumenfeld Z, Lanir N (1999)

Thrombophilic polymorphisms are common in women with fetal loss without apparent cause.

Thromb Haemost 82 (1): 6-9

Brown E T, Fuller G M (1998)

Detection of a complex that associates with the B β fibrinogen G₋₄₅₅-A polymorphism.

Blood 92(9):3286-3293

Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou J P, Arveiler D, Luc G, Bard J M, Bara L, Ricard S, Tiret L, Amouyel P, Alhenc-Gelas F, Soubrier F (1992)

Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction.

Nature 359: 641-643

Carp H, Toder V, Aviram A, Daniely M, Mashiach S, Barkai G (2001)

Karyotype of the abortus in recurrent miscarriage.

Fertil Steril 75: 678-682

Carter A M, Catto A J, Bamford J M, Grant P J (1997)

Gender-specific associations of the fibrinogen B beta 448 polymorphism, fibrinogen levels, and acute cerebrovascular disease.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 17(3): 589-594

Carter A M, Mansfield M W, Stickland M H, Grant P J (1996)

B-fibrinogen gene -455 G/A-polymorphism and fibrinogen levels: risk factors for coronary artery disease in subjects with NIDDM.

Diabetes Care 19: 1265

Coumans A B, Huijgens P C, Jakobs C, Schats R, de Vries J I, van Pampus M G, Dekker G A (1999)

Haemostatic and metabolic abnormalities in women with unexplained recurrent abortion.

Hum Reprod 14 (1): 211-214

Cowchock F S (1991)

The role of antiphospholipid antibodies in obstetric medicine.

Curr Obstet Med 1: 229-247

Cramer D W, Wise L A (2000)

The epidemiology of recurrent pregnancy loss.

Semin Reprod Med 18: 331-339

Creighton T E (1999)

Encyclopedia of Molecular Biology Volume 3

John Wiley & Sons, Inc., New York

Daniely M, Aviram-Goldring A, Barkai G, Goldman B (1998)

Detection of chromosomal aberration in fetuses arising from recurrent spontaneous abortion by comparative genomic hybridization.

Hum Reprod 13: 805-809

De Maat M P M, Kastelein J J P, Jukema J W et al. (1998)

-455 G/A polymorphism of the b-fibrinogen gene is associated with the progression of coronary atherosclerosis in symptomatic men: proposed role for an acute phase reaction pattern of fibrinogen.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 18: 265

Doria A, Warram JH, Krolewski AS (1994)

Genetic predisposition to diabetic nephropathy. Evidence for a role of angiotensin 1-converting enzyme gene.

Diabetes 43: 690-695

Dyerberg J, Stoffersen E (1980)

Recurrent thrombosis in a patient with factor XII deficiency.

Acta Haematol 63: 278-282

Erllich H A (Hrsg) (1989)

PCR technology: principles and applications for DNA amplification.

Stockton Press, New York

Fatini C, Gensini F, Battaglini B, Prisco D, Cellai A P, Fedi S, Marcucci R, Brunelli T, Mello G, Parretti E, Pepe G, Abbate R (2000)

Angiotensin-converting enzyme DD genotype, angiotensin type 1 receptor CC genotype, and hyperhomocysteinemia increase first-trimester fetal-loss susceptibility.

Blood Coagul Fibrinolysis 11 (7): 657-662

Faulk W P, Coulam C B, Mc Intyre (1990)

Recurrent pregnancy loss.

In: Infertility; Seibel MM (eds); Appleton, Lange. Connecticut: 273-284

Feener E P, Northrup J M, Aiello L P, King L P (1995)

Angiotensin II induces plasminogen activator inhibitor-1 and -2 expression in vascular endothelial and smooth muscle cells.

J Clin Invest 95: 1353-1362

Ferrer-Antunes C (1998)

Polymorphisms of coagulation factor genes – a review.

Clin Chem Lab Med 36(12): 897-906

Flint S, Gibb D M (1996)

Pre-implantation genetic diagnosis.

Br Med Bull 56: 672-690

Fogo A B, Vaughan D E (1998)

Compound interest: ACE and PAI-1 polymorphisms and risk of thrombosis and fibrosis.

Kidney International 54: 1765-1766

Forstner R, Hricak H (1994)

Congenital malformations of uterus and vagina.

Radiologe 34: 397-404

Garcia-Ribes M, Gonzalez-Lamuno D, Hernandez-Estefania R, Colman T, Pocovi M, Delgado-Rodriguez M, Garcia-Fuentes M, Revuelta J M (1998)

Polymorphism of the platelet glycoprotein IIIa gene in patients with coronary stenosis.

Thromb Haemost 79: 1126-1129

Gardemann A, Schwartz O, Haberbosch W et al. (1997)

Positive association of the b fibrinogen H1/H2 gene variation to basal fibrinogen levels and to increase in fibrinogen concentration during acute phase reaction but not to coronary artery disease and myocardial infarction.

Thromb Haemost. 77: 1120

Gardemann A, Lohre J, Katz N, Tillmanns H, Hehrlein F W, Haberbosch W (1999)

The 4G4G genotype of the plasminogen activator inhibitor 4G/5G gene polymorphism is associated with coronary atherosclerosis in patients at high risk for this disease.

Thromb Haemost. 82: 1121

Glueck C J, Awadalla S G, Phillips H, Cameron D, Wang P, Fontaine R N (2000)

Polycystic ovary syndrome, infertility, familial thrombophilia, familial hyperfibrinolysis, recurrent loss of in vitro fertilized embryos, and miscarriage.

Fertil Steril 74 (2): 394-397

Glueck C J, Phillips H, Cameron D, Wang P, Fontaine R N, Moore S K, Sieve-Smith L, Tracy T (2000)

The 4G/4G polymorphism of the hypofibrinolytic plasminogen activator inhibitor type 1 gene: an independent risk factor for serious pregnancy complications.

Metabolism 49: 845-852

Glueck C J, Kupfermine M J, Fontaine R N, Wang P, Weksler B B, Eldor A (2001)

Genetic hypofibrinolysis in complicated pregnancies.

Obstet Gynecol 97: 44-48

Greer I A (2000)

The challenge of thrombophilia in maternal-fetal medicine.

N Engl J Med 342: 424-425

Heidenreich R, Eisman R, Surrey S, Delgrosso K, Bennett J S, Schwartz E, Poncz M (1990)

Organisation of the gene for platelet glycoprotein IIb.

Biochemistry 29: 1232-1244

Herrmann S M, Poirier O, Marques-Vidal P et al. (1997)

The Leu 33/Pro polymorphism (PIA1/PIA2) of the glycoprotein IIIa (GPIIIa) receptor is not related to myocardial infarction in the ECTIM Study.

Thromb Haemost. 77: 1179

Hoffmann-La Roche AG (Hrg.) (1999)

Roche Lexikon Medizin

Urban und Schwarzenberg, München- Wien

Humphries S E, Panahloo A, Montgomery H E, Green F, Yudkin J (1997)

Gene-environment interaction in the determination of levels of haemostatic variables involved in thrombosis and fibrinolysis.

Thromb Haemost 78(1): 457-461

Iacoviello L, Burzotta F, Di Castelnuovo A, Zito F, Marchioli R, Donati M B (1998)

The 4G/5G polymorphism of PAI-1 promoter gene and the risk of myocardial infarction: a meta-analysis.

Thromb Haemost 80: 1029

Iwai N, Tamaki S, Nakamura Y, Ohmichi N, Yoshida M, Kinoshita M (1998)

I/D polymorphism of angiotensin converting enzyme gene and myocardial infarction.

Rinsho Byori 46 (7): 666-670

Jacobs P A, Hassold T J (1986)

Chromosome abnormalities: origin and etiology in abortions and livebirth.

In: Vogel F, Sperling K (eds.) Human Genetics, Proceedings of the 7th International Congress.

Springer Verlag, Berlin-Heidelberg

Jeng J R, Harn H J, Yueh K C, Jeng C Y, Shieh S M (1998)

Plasminogen activator inhibitor-1 and angiotensin I converting enzyme gene polymorphism in patients with hypertension.

Am J Hypertens 11 (2): 235-239

Jones H W (1992)

Uterine factors in repeated miscarriage.

Acta Europ Fertil (23): 271-274

Kessler C, Spitzer C, Stauske D, Mende S, Stadlmüller J, Walther R, Rettig R (1997)

The apolipoprotein E and β -fibrinogen G/A-455 gene polymorphisms are associated with ischemic stroke involving large-vessel disease.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 17(11): 2880-2884

Kim DK, Kim JW, Kim S, Gwon HC, Ryu JC, Huh JE, Choo JA, Choi Y, Rhee CH, Lee WR (1997)

Polymorphism of angiotensin converting enzyme gene is associated with circulating levels of plasminogen activator inhibitor-1.

Arterioscler Thromb Vasc Biol 17: 3242-3247

Kimmig R, Knitza R (Hrg.), Girschick G, Hepp F, Wagner C (2000)

Gynäkologie pur.

Börm Bruckmeier Verlag, München

Kimura H, Gejyo F, Suzuki Y, Suzuki S, Miyazaki R, Arakawa M (1998)

Polymorphisms of angiotensin converting enzyme and plasminogen activator inhibitor-1 genes in diabetes and macroangiopathy.

Kidney International 54: 1659-1669

Klinke R, Silbernagl S (1996)

Lehrbuch der Physiologie

Thieme Verlag, Stuttgart – New York

Kovats S, Main E K, Librach C (1990)

A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblast.

Science 248: 220-223

Kupfermine M J, Eldor A, Steinman N, Many A, Bar-Am A, Jaffa A, Fait G, Lessing J B (1999)

Increased frequency of genetic thrombophilia in women with complications of pregnancy.

N Engl J Med 340: 9-13

Kupfermine M J, Fait G, Many A, Gordon D, Eldor A, Lessing J B (2000)

Severe preeclampsia and high frequency of genetic thrombophilic mutations.

Obstet Gynecol 96: 45-49

Kutteh W H (1999)

Recurrent pregnancy loss: an update.

Curr Opin Obstet Gynecol 11 (5): 435-439

Lane D A, Grant P J (2000)

Role of hemostatic gene polymorphisms in venous and arterial thrombotic disease.

Blood 95: 1517-32

Lockshin M D, Druzin M L, Goei S (1985)

Antibody to cardiolipin as a predictor of fetal distress or death in pregnant patients with systemic lupus erythematosus.

N Engl J Med 313: 152-156

Löffler G, Petrides P (1998)

Biochemie und Pathobiochemie.

Springer Verlag, Berlin – Heidelberg

Loskutoff D J, Samad F (1998)

The adipocyte and hemostatic balance in obesity: Studies of PAI-1.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 18: 1-6

Mamotte C D, van Bockxmeer F M, Taylor R R (1998)

PIA1/A2 polymorphism of glycoprotein IIIa and risk of coronary artery disease and restenosis following coronary angioplasty.

Am J Cardiol. 82: 13

Margaglione M, Cappucci G, Colaizzo D, Guiliani N, Vecchione G, Grandone E, Pennelli O, Di Minno G (1998)

The PAI-1 gene locus 4G/5G polymorphism is associated with a family history of coronary artery disease.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 18: 152-156

Margaglione M, Cappucci G, Colaizzo D, Pirro L, Vecchione G, Grandone E, Di Minno G (1998)

Fibrinogen plasma levels in an apparently healthy general population – relation to environmental and genetic determinants.

Thromb Haemost 80: 805-810

Margaglione M, Cappucci G, D'Addeda M, Colaizzo D, Guiliani N, Vecchione G, Mascolo G, Grandone E, Di Minno G (1998)

PAI-1 plasma levels in an general population without clinical evidence of atherosclerosis: relation to environmental and genetic determinants.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 18(4): 562-567

Margaglione M, Grandone E, Vecchione G, Cappucci G, Giuliani N, Colaizzo D, Celentano E, Panico S, Di Minno G (1997)

Plasminogen activator inhibitor - 1 (PAI-1) antigen plasma levels in subjects attending a metabolic ward: relation to polymorphisms of PAI-1 and angiotensin converting enzyme (ACE) genes.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 17(10): 2082-2087

Marre M, Bernadet P, Gallois Y, Savagner F, Guyene T-T, Hallab M, Cambien F, Passa P, Alhenc-Gelas F (1994)

Relationships between angiotensin I converting enzyme gene polymorphism, plasma levels, and diabetic retinal and renal complications.

Diabetes 43: 384-388

Martinelli I, Sacchi E, Landi G, Taioli E, Duca F, Mannucci P M (1998)

High risk of cerebral-vein thrombosis in carriers of a prothrombin-gene mutation and in users of oral contraceptives.

N Engl J Med 338: 1793-1797

Martius G, Breckwoldt M, Pfleiderer A (1996)

Lehrbuch der Gynäkologie und Geburtshilfe.

Thieme Verlag, Stuttgart – New York

Matalon S T, Blank M, Ornoy A, Shoenfeld Y (2001)

The association between anti-thyroid antibodies and pregnancy loss.

Am J Repr Immunol 45: 72-77

Matsubara Y, Hayakawa T, Tsuda T, Takeshita E, Watanabe G, Murata M, Watanabe K, Ikeda Y (2000)

Angiotensin converting enzyme insertion/deletion polymorphism is associated with plasma antigen levels of plasminogen activator inhibitor-1 in healthy Japanese population.

Blood Coagul Fibrinolysis 11 (2): 115-120

Matzner W, Chong P, Xu G (1994)

Characterization of antiphospholipid antibodies in woman with recurrent spontaneous abortion.

J Reprod Med 39: 27-30

Mullis K B, Faloona F A (1987)

Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.

Methods Enzymol 155: 335-350

Newman P J, Derbes R S, Aster R H (1989)

The human platelet alloantigens, PIA₁ and PIA₂, are associated with a leucine³³ / proline³³ amino acid polymorphism in membrane glycoprotein IIIa, and are distinguishable by DNA typing.

J Clin Invest 83: 1778-1781

Newton R, Rutherford A J (2001)

Early pregnancy loss.

Practitioner 245: 266-1, 274

Nishiuma S, Kario K, Yakushijin K et al. (1998)

Genetic variation in the promotor region of the b-fibrinogen gene is associated with ischemic stroke in a Japanese population.

Blood Coagul Fibrinolysis 9: 373

Odawara M, Matsunuma A, Yamashita K (1997)

Mistyping frequency of the angiotensin- converting enzyme gene polymorphism and an improved method for its avoidance.

Hum Genet 100: 163-166

Ogasawara M S, Aoki K, Katano K, Ozaki Y, Suzumori K (2001)

Factor XII but not protein C, protein S, antithrombin III, or factor XIII is a predictor of recurrent miscarriage.

Fertil Steril 75: 916-919

Pauer H U, Neesen J, Schlosser M, Hinney B, Rauskolb R (2000)

Homozygous factor V Leiden mutation in a woman with multiple adverse pregnancy outcomes.

Arch Gynecol Obstet 264: 164-165

Pihusch R, Buchholz T, Lohse P, Rübsamen H, Rogenhofer N, Hasbargen U, Hiller E, Thaler C J (2001)

Thrombophilic gene mutations and recurrent spontaneous abortion: Prothrombin increases the risk in first trimester.

Am J Repr Immunol 46: 124-131

Pfleiderer A, Breckwoldt M, Martius G (2000)

Gynäkologie und Geburtshilfe

Thieme Verlag, Stuttgart - New York

Press R D (2000)

Thrombophilic mutations impart a high risk of pregnancy-related venous thrombosis.

Mol Diagn 5: 158

Preston F E, Rosendaal F R, Walker I D, Briet E, Berntorp E, Conard J, Fontcuberta J, Makris M, Mariani G, Noteboom W, Pabinger I, Legnani C, Scharrer I, Schulman S, van der Meer F J (1996)

Increased fetal loss in women with heritable thrombophilia.

Lancet 348: 913-916

Qiagen GmbH (01/1997)

QIAamp Blood Kit and QIAamp Tissue Kit Handbook

Rai R, Backos M, Baxter N, Chilcott I, Regan L (2000)

Recurrent miscarriage – an aspirin a day?

Hum Reprod 15: 2220-2223

Regan L, Owen E J, Jacobs H S (1990)

Hypersecretion of luteinising hormone, infertility and miscarriage.

Lancet 336: 1141

Ridker P M, Gaboury C L, Conlin P R, Seely E W, Williams G H, Vaughan D E (1993)

Stimulation of plasminogen activator inhibitor in vivo by infusion of angiotensin II. Evidence of a potential interaction between the renin-angiotensin system and fibrinolytic function.

Circulation 87:1969-1973

Ridker P M, Hennekens C H, Schmitz C, Stampfer M J, Lindpaintner K (1997)

PIA1/A2 polymorphism of platelet glycoprotein IIIa and risks of myocardial infarction, stroke and venous thrombosis.

Lancet 349: 385-388

Ridker P M, Hennekens C H, Lindpaintner K, Stampfer M J, Miletich J P (1997)

Arterial and venous thrombosis is not associated with the 4G/5G polymorphism in the promotor of the plasminogen activator inhibitor gene in a large cohort of US men.

Circulation 95: 59-62

Rieder M J, Taylor S L, Clark A G, Nickerson D A (1999)

Sequence variation in the human angiotensin converting enzyme.
Nat Genet 22(1): 59-62

Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier F (1990)

PCR detection of the insertion/deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (ACE 1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1).
Nucleic Acids Research 20(6): 1433

Saiki R K, Gelfand D H, Stoffel S, Scharf S J, Higuchi R, Horn G T, Mullis K B, Ehrlich H A (1988)

Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.
Science 239: 487-491

Saiki R K (1989)

Optimization of the polymerase chain reaction.
In: Erlich H A, Kazazian H H, Gibbs R A (eds.) Current Communications in Molecular Biology.
Cold Spring Harbour Laboratory Press: 25-30

Sailing E (1984)

Der frühe totale operative Muttermundverschluß bei anamnestischem Abort- und Frühgeburtrisiko.
Gynäkologe 17: 225-227

Samani N J, Lodwick D (1997)

Glycoprotein IIIa polymorphism and risk of myocardial infarction.
Cardiovascular Research 33: 693-697

Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T (1989)

Molecular cloning. A laboratory manual.
Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2.Aufl.

Sarto A, Rocha M, Martinez M, Sergio Pasqualini R (2000)

Hyperfibrinolysis and other hemostatic defects in woman with antecedents of early reproductive failure.

Medicina (B Aires) 60 (4): 441-447

Sartori M T, Wiman B, Vettore S, Dazzi F, Girolani A, Patrassi G M (1998)

4G/5G polymorphism of PAI-1 gene promotor and fibrinolytic capacity in patients with deep vein thrombosis.

Thromb Haemost 80: 956-960

Schambeck C M, Eberl E, Geisen U, Grossmann R, Keller F (2001)

The impact of dalteparin (Fragmin) on thrombin generation in pregnant woman with venous thromboembolism: significance of the factor V leiden mutation.

Thromb Haemost 85: 782-786

Schettler G, Greten H (1998)

Innere Medizin.

Thieme Verlag, Stuttgart - New York

Schmidt-Matthiesen H, Hepp H (1998)

Gynäkologie und Geburtshilfe: Lehrbuch für Studium und Praxis.

Schattauer Verlag, Stuttgart - New York

Schmidt S, Schöne N, Ritz E (1995)

Association of ACE gene polymorphism and diabetic nephropathy? The Diabetic Nephropathy Study Group.

Kidney Int. 47: 1176-1181

Segal M, Bishop K, Ridley N (1988)

Recurrent early miscarriage and early polycystic ovaries.

Brit Med J 297: 1027

Seino Y, Ikeda U, Maeda Y, Haga Y, Yashima H, Shimada K (1998)

Angiotensin converting enzyme gene polymorphism and plasminogen activator inhibitor 1 levels in subjects with cerebral infarction.

J Thromb Thrombolysis 5 (3): 263-267

Stauber M, Weyerstahl T (2001)

Gynäkologie und Geburtshilfe.

Thieme Verlag, Stuttgart (Duale Reihe)

Stray-Peterson B, Stray-Peterson S (1984)

Ethiological factors and subsequent reproductive performance in 195 couples with a prior history of habitual abortion.

Am J Obstet Gynecol 148: 140-146

Strowitzki T, Korell M, Thaler C J, Wolff H (1996)

Ungewollte Kinderlosigkeit – Diagnostik und Therapie von Fertilitätsstörungen.

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart

Thaler C J (1996)

Rezidivierende Spontanaborte (RSA)

In: Strowitzki T: Ungewollte Kinderlosigkeit – Diagnostik und Therapie von Fertilitätsstörungen.

Gustav Fischer Verlag, Stuttgart: 173-202

Thaler C J (1992)

Anti-idiotypische Regulation materno-fetaler Immunreaktionen.

In: Stolz W, Wallwiener D, Bastert G (Hrsg): Immunglobuline in der Frauenheilkunde.

Springer Verlag, Berlin - Heidelberg: 70-83

Thogersen A M, Jansson J H, Boman K, Nilsson T K, Weinehall L, Huhtasaari F, Hallmans G (1998)

High plasminogen activator inhibitor and tissue plasminogen activator levels in plasma precede a first acute myocardial infarction in both men and women: evidence for the fibrinolytic system as an independent primary risk factor.

Circulation 98: 2241-2247

Thomas A E, Green F R, Kelleher C H, Wilkes H C, Brennan P J, Meade T W, Humphries S E (1991)

Variation in the promotor region of the β fibrinogen gene is associated with plasma fibrinogen levels in smokers and non-smokers.

Thromb Haemost 65(5): 487-490

Tindall K R, Kunkel T A (1988)

Fidelity of DNA synthesis by the *Thermus aquaticus* DNA polymerase.

Biochemistry 27: 6008-6013

Tiret L, Rigat B, Visvikis S, Breda C, Corvol P, Cambien F, Soubrier F (1992)

Evidence, from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels.

Am J Hum Genet 51: 197-205

Trams G (Hrsg.) (1990)

Die gestörte Frühschwangerschaft.

Springer Verlag, Berlin - Heidelberg

Van der Bom J G, De Maat M P M, Bots M L, Haverkate F, De Jong P T V M, Hofman A, Kluft C, Grobbee D E (1998)

Elevated plasma fibrinogen – cause or consequence of cardiovascular disease?

Arterioscler Thromb Vasc Biol 18: 621-625

Vaquero E, Lazzarin N, Valensise H, Menghini S, Di Pierro G, Cesa F, Romanini C (2001)

Pregnancy outcome in recurrent spontaneous abortion associated with antiphospholipid antibodies: a comparative study of intravenous immunoglobulin versus prednisone plus low-dose aspirin.

Am J Repr Immunol 45: 174-179

Vassalli J D, Sappino A P, Belin D (1991)

The plasminogen activator plasmin system.

J Clin Invest 88: 1067-1072

Verlinsky Y, Kuliev A (1998)

Progress in preimplantation genetics.

J Assist Reprod Genet 15: 9-11

Verlinsky Y (1999)

Preimplantation diagnosis: an alternative to prenatal diagnosis of genetic and chromosomal disorders.

J Assist Reprod Genet 16: 161-164

Wang X L, Wang J, Mc Credie R M, Wilcken D E L (1997)

Polymorphisms of Factor V, Factor VII and Fibrinogen Genes.

Arterioscler Thromb Vasc Biol. 17: 246-251

Ward K J (2000)

Genetic factors in recurrent pregnancy loss.

Semin Reprod Med 18: 425-432

Weiss E J, Bray P F, Tayback M, Schulman S P, Kickler T S, Becker L C, Weiss J L, Gerstenblith G, Goldschmidt-Clermont P J (1996)

A polymorphism of a platelet glycoprotein receptor as an inherited risk factor for coronary thrombosis.

N Engl J Med 17: 1090-1094

Wong T Y, Poon P, Szeto C C, Chan J C, Li P K (2000)

Association of plasminogen activator inhibitor-1 4G/4G genotype and type 2 diabetic nephropathy in Chinese patients.

Kidney Int. 57 (2): 632-638

Yamada H, Kato E H, Kobashi G, Ebina Y, Shimada S, Morikawa M, Yamada T, Sakuragi N, Fujimoto S (2000)

Recurrent pregnancy loss: etiology of thrombophilia.

Semin Thromb Hemost 27 (2): 121-129

Younis J S, Brenner B, Ohel G, Tal J, Lanir N, Ben-Ami M (2000)

Activated protein C resistance and factor V Leiden mutation can be associated with first as well as second trimester recurrent pregnancy loss.

Am J Repr Immunol 43: 31-35

Zenzes M T, Wang P, Casper R F (1992)

Chromosome status of untransferred (spare) embryos and probability of pregnancy after in-vitro fertilisation.

Lancet 340: 391-394

Zhu M, Xia Y, Cheng W (1998)

Study on a deletion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene in pregnancy induced hypertension.

Chung Hua Fu Chan Ko Tsa Chih 33: 83-5

8. Danksagung

Ich danke **Herrn Prof. Dr. Hermann Hepp** sehr herzlich, daß ich die vorliegende Arbeit an der Frauenklinik im Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität München durchführen durfte.

Herrn Prof. Dr. C.J. Thaler danke ich besonders für die Überlassung des inspirierenden Themas, die Einarbeitung in die Thematik der rezidivierenden Aborte, die hervorragende Betreuung und hilfreiche Unterstützung in jeder Phase der Arbeit.

Ein ganz herzlicher Dank gilt **Frau Dr. Tina Buchholz** für die außerordentlich wertvolle Unterstützung bei dem klinischen Teil der Arbeit, für die vielfältigen Anregungen beim Verfassen der Arbeit sowie für die umfangreiche Hilfestellung und den Beistand bei der Vorbereitung des Vortrages und der Poster zu diesem Thema.

Ebenso möchte ich mich besonders bei **Herrn Priv. - Doz. Dr. Peter Lohse** für die Möglichkeit bedanken, daß ich den experimentellen Teil der Arbeit im molekularbiologischen Labor des Institutes für Klinische Chemie des Klinikums Großhadern durchführen durfte. Ich danke sehr für die fundierte Anleitung, sowie für die unermüdliche Hilfe und engagierte Betreuung. Durch seine freundliche Art, jederzeit für Fragen ansprechbar zu sein, war er mir eine wichtige Stütze.

Mein Dank gilt auch **Herrn Dr. Rudolf Pihusch** für die Auseinandersetzung und Diskussion zum Thema der „Hämostase“ sowie für die wertvolle Hilfe bei der statistischen Auswertung.

Frau Pia Lohse bin ich für die praktischen Ratschläge und kontinuierliche Unterstützung zu großem Dank verpflichtet.

Frau Heike Rübsamen möchte ich für die Einführung und geduldige Einarbeitung in den Laborablauf sowie die Rücksichtnahme und hilfreiche Anleitung bei der Laborarbeit Dank sagen.

Allen Mitarbeitern der Frauenpoliklinik und dem Team des Labors der Klinischen Chemie danke ich für die vielen ungenannten „Kleinigkeiten“, ohne die eine erfolgreiche Durchführung nicht zustande gekommen wäre.

Nicht vergessen bei meiner Danksagung möchte ich die **Patientinnen**, ohne deren Einverständnis und Hilfe diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Zuletzt, und mir doch am Wichtigsten, gilt ewiger Dank vor allem **meinen Eltern**, die mir die Einstellung zum Erreichen meiner Ziele vermittelten, Rückhalt boten und mir stets Ihre unbeschreibliche persönliche und liebevolle Unterstützung für meinem bisherigen Weg gaben.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name:	Nina Katrin Rogenhofer
Geburtsdatum, -ort:	5. Juli 1976 in Regensburg
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Eltern:	Ildiko Marta Rogenhofer, geb. Stenzel, Pharmazeutin Dr. med. Gert Rogenhofer

Schulausbildung:

1982-1986	Grundschule Sallern, Regensburg
1986-1995	Privat-Gymnasium Pindl, Regensburg
1995	Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung:

8-10/1996	Pflegepraktikum im Krankenhaus St. Joseph, Regensburg
1996-1998	Vorklinischer Abschnitt des Studiums für Humanmedizin an der Friedrich-Alexander-Universität Erlangen
3/1998	Ärztliche Vorprüfung
1998-2001	Klinischer Abschnitt des Studiums für Humanmedizin an der LMU München
3/1999	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
3/2001	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
11/2002	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Famulaturen:

8/1998	Famulatur in der Abteilung für Plastische Chirurgie im Krankenhaus St. Joseph, Regensburg
9/1998	Famulatur in der Abteilung für Viszeral-, Unfall- und Gefäßchirurgie im Krankenhaus St. Joseph, Regensburg
8-9/1999	Famulatur in einer Praxis für Allgemeinmedizin und Psychotherapie, Regensburg
4/2000	Famulatur an der University of Texas, Dallas im Fachbereich Chirurgie, Plastische Chirurgie und Kinderchirurgie

Praktisches Jahr:

8-12/2001	Innere Medizin im Krankenhaus München-Neuperlach
12-3/2002	Gynäkologie und Geburtshilfe in der Frauenklinik im Klinikum Großhadern
3-5/2002	Kinderchirurgie an der University of Sydney
5-7/2002	Chirurgie im Krankenhaus München-Neuperlach

Studienbegleitende Tätigkeit:

Mitglied im Studentischen Beirat des Uni-Med
Verlages, Tätigkeit im Lektorat

Weiterbildung:

9/2001	Chirurgischer Sonographie Grundkurs und Aufbaukurs der DEGUM
Seit 12/2002	Ärztin im Praktikum in der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe im Klinikum Großhadern